

Національний технічний університет України  
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»  
Міністерство освіти і науки України

Національний технічний університет України  
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»  
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**МОТРОНЕНКО ВАЛЕНТИНА ВАСИЛІВНА**

УДК 573.6.083.3+573.6.086.8

**ДИСЕРТАЦІЯ**  
**БІОТЕХНОЛОГІЯ СУБСТАНЦІЇ РЕКОМБІНАНТНОГО**  
**ІНТЕРЛЕЙКІНУ-7 ЛЮДИНИ**

16 Хімічна та біоінженерія  
162 Біотехнології та біоінженерія

Подається на здобуття освітнього ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело:

—\_\_\_\_\_ Валентина МОТРОНЕНКО

Наукові керівники:

Галкін Олександр Юрійович, доктор біологічних наук, професор;

Ружинська Людмила Іванівна, кандидат технічних наук, доцент.

Київ – 2020

## АНОТАЦІЯ

*Мотроненко В.В.* Біотехнологія субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини.–Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 16 Хімічна та біоінженерія за спеціальністю 162 Біотехнології та біоінженерія. – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України. Київ, 2020.

Робота виконана на кафедрі промислової біотехнології та кафедрі трансляційної медичної біоінженерії КПІ ім. Ігоря Сікорського.

Зараз спостерігається стрімкий прогрес усіх галузей науки та промисловості, що застосовують високі технології та, в першу чергу, біотехнології. Одним з напрямів сучасної біотехнології є імунобіотехнологія, яка формувалася в останні два десятиріччя і має на меті цілеспрямований біосинтез нових біологічно активних препаратів та фармацевтичних продуктів, до яких належать моноклональні антитіла, вакцини, сироватки, цитокіни, діагностичні засоби, імуномодулятори та пробіотики.

Інтерлейкін-7 людини (ІЛ-7) – лімфопоетичний фактор росту, який займає особливе положення серед інших цитокінів через його унікальну функцію в гематопоезі, що не дублюється іншими факторами. Відсутність функціонального ІЛ-7 може бути однією з причин важкого комбінованого імунодефіциту. Результатом відсутності функціонального ІЛ-7 в організмі є лімфопенія та, як наслідок, важкий імунодефіцит. При збільшенні кількості ІЛ-7 рівень В- і Т-лімфоцитів в крові підвищується. ІЛ-7 бере участь у формуванні лімфовузлів. Основними продуцентами ІЛ-7 є стромальні клітини кісткового мозку та тимуса, а також деякі інші клітини організму людини.

Наявні дані свідчать про можливість використання ІЛ-7 в комплексній терапії при лікуванні вірусних та бактеріальних інфекцій. ІЛ-7 розглядається й як засіб для лікування низки онкологічних захворювань (зокрема, таких як гліома, меланома, гліобластома, рак передміхурової залози). Біологічний потенціал ІЛ-7 дозволяє вважати, що його використання може стимулювати імунітет у пацієнтів

з лімфоцитарним виснаженням (у т.ч. на тлі хронічних інфекційних захворювань), аутоімунними захворюваннями тощо.

Зважаючи на сучасні досягнення молекулярної біології та біотехнології у галузі отримання білків медичного призначення найбільш перспективним видається підхід до отримання ІЛ-7 на основі рекомбінантного продуцента. Оптимізація процесів біосинтезу рекомбінантних продуктів медичного призначення є актуальною задачею біотехнології, особливо з позицій техніко-економічних показників, оскільки вихід цільових продуктів, особливо при застосуванні багатоетапних складних процедур виділення та очистки білків, впливає на вартість отримуваних медичних препаратів та, відповідно, на їх соціальну доступність. Один із напрямків підвищення виходу рекомбінантних продуктів у бактеріальних системах біосинтезу адресований до оптимізації складу живильних середовищ. Особлива увага при розробці сучасних технологій отримання рекомбінантних білків приділяється удосконаленню способів виділення та очистки цільового продукту.

*Мета роботи* – наукове обґрунтування біотехнології отримання субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини.

Для досягнення поставленої мети були поставлені наступні *задачі*.

1. Оптимізувати кількісний та якісний склад живильного середовища для біосинтезу рІЛ-7 бактеріями *Escherichia coli*.
2. Дослідити можливість підвищення біосинтетичної активності мікробного продуцента рІЛ-7 за рахунок додавання до живильного середовища рослинних екстрактів та вітамінів, у звичайній й у ліпосомальній формах.
3. Розробити високоспецифічну імуноафінну методику очистки рІЛ-7.
4. Дослідити ефективність застосування рІЛ-7 для лікування ранових інфекцій в експерименті.
5. Розробити технологічну та апаратурну схеми отримання субстанції рІЛ-7 людини й провести оцінку ризиків виробничого процесу.
6. Провести техніко-економічну оцінку розробленої технології отримання рІЛ-7.

*Об'єкт дослідження* – біотехнологічні основи отримання субстанції рІЛ-7 та науково-методичні принципи стандартизації їх виробництва.

*Предмет дослідження* – оптимізація процесу біосинтезу рІЛ-7, удосконалення технології очистки рІЛ-7, імуномодуюча активність рІЛ-7 *in vivo*, апаратурно-технологічна реалізація виробничого процесу отримання субстанції рІЛ-7 та аналіз його ризиків.

*Методи дослідження* – біотехнологічні, мікробіологічні, біохімічні, фізико-хімічні, математичні та графоаналітичні.

Наукова новизна отриманих результатів. Оптимізовано склад живильного середовища для біосинтезу рІЛ-7 бактеріями *E. coli* (вихід – 0,95 мг/мл) із високою біологічною активністю *in vitro* та *in vivo*, що дозволило підвищити вихід рІЛ-7 у 1,3 рази у порівнянні із базовою технологією. Показано стимулюючу дію екстрактів клівії кіноварної і зеферантесу великоквіткового (0,5-1,0%) та ліпосомальної форми вітаміну К<sub>1</sub> (15-25 мг/мл) як стимулюючих добавок до поживного середовища (приводить до збільшення виходу цільового продукту у 1,69 рази). Біологічно активні речовини досліджених фітоекстрактів взаємодіють з поринами зовнішньої мембрани *E. coli*, що, ймовірно, є причиною підвищення біосинтетичної активності рекомбінантного продуцента. Показано, що застосування рІЛ-7 (5мкг рІЛ-7 на добу внутрішньочеревно, щодня до загоєння рани) прискорює швидкість загоєння ран у дослідних тварин та елімінації *Pseudomonas aeruginosa* із них. Результати роботи доповнили сучасні науково-методичні підходи створення препаратів рекомбінантних білків терапевтичного призначення.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблено технологічну та апаратурну схему отримання субстанції рІЛ-7 та проведено аналіз критичних точок виробничого процесу. Розроблену технологію отримання субстанції рІЛ-7 апробовано у відділі регуляторних відносин, менеджменту якості та науково-технічних розробок ТОВ «УА «ПРО-ФАРМА» (м. Київ). Результати роботи впроваджено у навчальний процес у КПІ ім. Ігоря Сікорського, а саме: у викладання курсу «Медична біотехнологія» для студентів спеціальності

163 Біомедична інженерія на кафедрі трансляційної медичної біоінженерії та курсу «Медична біотехнологія-2. Імунобіотехнологія» для студентів спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія на кафедрі промислової біотехнології.

Експериментально обґрунтовано раціональний кількісний склад органічних компонентів та мінеральних речовин живильного середовища для культивування рекомбінантного продуценту *E. coli*, що дозволило збільшити вихід рІЛ-7 у 1,3 рази.

Доведено стимулюючу дію екстрактів клівії кіноварної і зефірантесу великоквіткового як добавок до живильного середовища при культивуванні рекомбінантних бактерії *E. coli* в діапазоні 0,5-1,0%, що забезпечувало підвищення виходу цільового продукту в 1,69-1,82 рази. Показано стимулюючий вплив ліпосомальної форми вітаміну К<sub>1</sub> в концентрації 15-25 мг/мл на рівень біосинтезу рІЛ-7 (збільшення в 1,74-1,81 рази). Показано, що механізми біологічної активності фітоекстрактів на синтез рІЛ-7 бактеріальними продуцентами, включають взаємодію з поверхневими структурами бактеріальної клітини.

Розроблено удосконалену схему очистки рІЛ-7 за рахунок введення стадії високоспецифічної імуноафінної хроматографії, що дозволило досягти чистоти отримуваної субстанції на рівні 98%. Для синтезованої імуноафінної колонки на основі тетраетоксисилану визначено раціональні технологічні параметри хроматографічної очистки, які дозволяють отримувати високоочищений продукт упродовж 15 циклів безперервної роботи та у широкому діапазоні концентрацій продукту (0,005-20мкг/мл).

Експериментально доведено ефективність застосування рІЛ-7 при лікуванні ранової інфекцій *P. aeruginosa*. Показано, що у мишей, які отримували лікування препаратом рІЛ-7 (5мкг на добу внутрішньочеревно), загоєння ран і елімінація збудника настає на 5 днів раніше, ніж у мишей без лікування препаратом рІЛ-7.

Розроблено технологічну та апаратурно-технологічну схему отримання субстанції рІЛ-7 людини на основі отриманих експериментальних даних. Проведено оцінку ризиків технологічного процесу отримання субстанції рІЛ-7 та визначено найбільш критичні стадії, що дозволило розробити систему контролю виробництва для запобігання та мінімізації ризиків.

Проведено техніко-економічну оцінку розробленої технології отримання субстанції рІЛ-7: визначено собівартість кінцевого продукту та потужність виробництва з огляду на забезпеченість пацієнтів України та поширеність відповідних патологій. Розрахункова потужність виробництва склала 240г субстанції рІЛ-7 на рік, а її собівартість – 43 478грн. Розрахункова сировина собівартість готової ін'єкційної форми препарату рІЛ-7 (3-60мкг на дозу) становить 38-1512грн., що обумовлює його соціальну доступність для населення України.

Особистий внесок здобувача. Результати роботи, які викладено в дисертації, одержані автором особисто або за його безпосередньої участі. Планування експериментальної роботи проводилися спільно із науковими керівниками. Особисто автором описані результати досліджень, проведено їх аналіз та обговорення. Спільно із науковими керівниками сформувано висновки.

За темою дисертаційної роботи опубліковано 16 праць, 1 стаття у періодичному науковому фаховому виданні держави, яка входить до Організації економічного співробітництва та розвитку та Європейського Союзу (Словаччина), та яке цитуються у науково-метричній базі SCOPUS; 6 статей у наукових виданнях, включених до переліку наукових фахових видань України, у т.ч. 2 статті у виданні, що цитуються у науково-метричній базі SCOPUS; 1 стаття в фахових виданнях інших країн. Результати оприлюднені в дисертації апробовані та обговорені на 8 міжнародних та вітчизняних конференціях.

Ключові слова: рекомбінантний інтерлейкін-7 людини, живильне середовище, фітоекстракти, вітамін К<sub>1</sub>, біологічна активність, технологія, стандартизація.

## SUMMARY

*Motronenko V.* Biotechnology of the substance of recombinant human interleukin-7. – Qualifying scientific work, the manuscript

Thesis for the Doctor of Philosophy in 16 Chemical and Bioengineering, specialty 162 Biotechnology and Bioengineering. – National Technical University of Ukraine “Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute”, Ministry of Education and Science of Ukraine. Kyiv, 2020.

Currently, there is rapid progress in all high-tech and, most of all, biotechnology industries. Among the modern biotechnology trends is immunobiotechnology, which has been formed in the last two decades and aims at the targeted biosynthesis of new biologically active drugs and pharmaceutical products. This includes monoclonal antibodies, vaccines, sera, cytobiotic drugs, cytobiotic drugs.

Human's interleukin-7 (IL-7) is a lymphopoietic growth factor that holds a special position among other cytokines because of its unique function in hematopoiesis, which is not duplicated by other factors. Lack of functional IL-7 may be one of the causes of severe combined immunodeficiency. The result of functional's lack IL-7 in the body is lymphopenia and, as a consequence, severe immunodeficiency. The level of B- and T-lymphocytes in the blood increases with the increase in the number of IL-7, IL-7 is involved in the lymph nodes' formation. The major producers of IL-7 are bone marrow and thymus stromal cells, as well as some other cells in the human body.

Evidence suggests that IL-7 may be used in complex therapy for the treatment of viral and bacterial infections. IL-7 is also considered as a treatment for a number of oncological diseases (in particular, such as glioma, melanoma, glioblastoma, prostate cancer). The biological potential of IL-7 suggests that its use can stimulate immunity in patients with lymphocytic depletion (including against chronic infectious diseases), autoimmune diseases, and the like.

Given the recent advances in molecular biology and biotechnology in the medical proteins' production, the most promising approach is to obtain IL-7 based on a recombinant producer. Optimization of biosynthesis processes of recombinant medical products is an urgent task of biotechnology, especially from the technical and economic

indicators point of view, since the output of the target products, especially when using multi-stage complex procedures for the isolation and purification of proteins, affects the cost of the obtained medicinal products, their social availability. One of the directions of increasing the yield of recombinant products in bacterial biosynthesis systems is addressed to optimizing the composition of nutrient media. Particular attention is devoted to the modern technologies' development for the production of recombinant proteins, and is given to improving the methods of isolation and purification of the target product.

*The purpose* of the work is scientific substantiation of biotechnology of obtaining substance of recombinant interleukin-7 person.

To achieve this goal, the following tasks were set.

1. To optimize the quantitative and qualitative composition of the nutrient medium for the biosynthesis of rIL-7 by *E. coli* bacteria.

2. To investigate the possibility of increasing the biosynthetic activity of the microbial producer rIL-7 by adding plant extracts and vitamins to the nutrient medium, in the usual and liposomal forms.

3. To develop a highly specific immunoaffinity purification method for rIL-7.

4. To investigate the effectiveness of the use of rIL-7 for the treatment of wound infections in the experiment.

5. To develop technological and equipment schemes for obtaining substance rIL-7 person and carry out risk assessment of the production process.

6. To conduct a feasibility study of the developed technology of obtaining rIL-7.

*The object* of the study is the biotechnological bases of obtaining substance rIL-7 and scientific and methodological principles of standardization of their production.

*The subject* of the study is optimization of the rIL-7 biosynthesis process, improvement of the rIL-7 purification technology, immunomodulatory activity of rIL-7 in vivo, instrumentation and technological realization of the production process of obtaining the substance rIL-7 and analysis of its risks.

*Research methods* are biotechnological, microbiological, biochemical, physicochemical, mathematical and graph analytical.



Scientific novelty of the obtained results. The composition of the nutrient medium for rIL-7 biosynthesis was optimized by *E. coli* bacteria (yield 0.95mg/ml) with high in vitro and in vivo biological activity, which increased the rIL-7 yield 1.3 times compared to the basic technology.

The stimulating effect extract of *Cliviaminiata* and *Zephyranthes grandiflora* (0.5-1.0%) and liposomal form of vitamin K<sub>1</sub> (15-25mg/ml) as stimulating additives to the nutrient medium is shown (leading to an increase in the yield of the target product 1.69 times).

The biologically active substances of the investigated phytoextracts interact with the pores of the outer membrane of *E. coli*, which is likely to cause an increase in the biosynthetic activity of the recombinant producer.

It has been shown that administration of rIL-7 (5mg rIL-7 daily intraperitoneally, daily before wound healing) accelerates the rate of wound healing in experimental animals and the elimination of *Pseudomonas aeruginosa* from them.

The results of the work are in close connection with the current scientific and methodological approaches for the creation of recombinant proteins for therapeutic purposes.

The practical significance of the results obtained. The technological and instrumental scheme of obtaining substance rIL-7 was developed and the critical points of the production process were analysed.

The developed technology of obtaining substance rIL-7 was tested in the department of regulatory relations, quality management and scientific and technical development of LLC "UA-PRO-PHARMA" (Kyiv).

The results of the work were implemented in the educational process in Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute, namely: in teaching the course "Medical Biotechnology" for students of specialty 163 Biomedical Engineering at the Department of Translational Medical Bioengineering and the course "Medical Biotechnology-2. Immunobiotechnology» for students of specialty 162 Biotechnology and bioengineering at the department of industrial biotechnology.

The rational quantitative composition of organic components and minerals of the nutrient medium for the cultivation of recombinant producer *E. coli* was experimentally substantiated, which allowed to increase the yield of rIL-7 1.3 times.

The stimulating effect of clover extracts of cinnabar and zephyrantes large-flowered as additives to the nutrient medium in the cultivation of recombinant *E. coli* bacteria in the range of 0.5-1.0%, which provided an increase in the yield of the target product 1.69-1.82 times. The stimulating effect of the liposomal form of vitamin K<sub>1</sub> at a concentration of 15-25mg/ml on the level of rIL-7 biosynthesis (an increase of 1.74-1.81 times) is shown. The mechanisms of biological activity of phytoextracts for the synthesis of rIL-7 by bacterial producers have been shown to include interaction with the surface structures of a bacterial cell.

An advanced scheme for purification of rIL-7 was developed by introducing a highly specific immunoaffinity chromatography step, which allowed the substance to be obtained at 98%. For the tetraethoxysilane-synthesized immunoaffinity column, rational technological parameters of chromatographic purification have been determined, which allow to obtain a highly purified product over 15 cycles of continuous operation and over a wide range of product concentrations (0.005-20µg/ml).

The efficacy of the use of rIL-7 in the treatment of *P. aeruginosa* wound infections has been experimentally proven. It was shown that in mice treated with rIL-7 (5µg per day intraperitoneally), wound healing and pathogen elimination occurred 5 days earlier than in mice without rIL-7 treatment.

The technological and equipment-technological scheme of obtaining the substance of human rIL-7 based on the obtained experimental data was developed. The risks of the process of obtaining the substance rIL-7 were evaluated and the most critical stages were identified, which allowed the development of a production control system to prevent and minimize risks.

The feasibility study of the developed technology of obtaining substance rIL-7 has been carried out: the cost of the final product and the production capacity have been determined in view of the safety of patients of Ukraine and the prevalence of relevant pathologies. The estimated production capacity was 240g of substance rIL-7 per year,

and its cost was 43 478UAH. The estimated raw material cost of the ready-to-use injection form of the drug rIL-7 (3-60 $\mu$ g per dose) is 38-1512UAH, which determines its social accessibility for the population of Ukraine.

Personal contribution of the applicant. The results of the thesis presented in the thesis were obtained by the author personally or with her direct participation. The planning of the experimental work was carried out jointly with the scientific supervisors. The author personally describes the results of the research, conducted their analysis and discussion. Conclusions have been drawn up with the scientific leaders.

On the topic of the dissertation, 16 papers were published, 1 article in the periodical scientific professional publication of the state, which is a member of the Organization for Economic Cooperation and Development and the European Union (Slovakia), which is cited in SCOPUS scientific-metric database; 6 articles in scientific editions included in the list of scientific professional editions of Ukraine, incl. 2 articles cited in SCOPUS scientific-metric database; 1 article in professional publications of other countries. The results published in the dissertation were tested and discussed at 8 international and national conferences.

Keywords: recombinant human interleukin-7, nutrient medium, phytoextracts, vitamin K<sub>1</sub>, biological activity, technology, standardization.

### Список публікацій автора

Статті:

1. **Motronenko VV**, Lutsenko TN, Ruzhynska LI., Gorshunov YuV, Galkin AYU. Comparative analysis of the effects of hydrodynamic conditions in submerged culturing of recombinant bacteria. Труды БГТУ, Серия 2: Химические технологии, биотехнология, геоэкология. 2017;2199:241-246. **(Республіка Білорусь)** *(Здобувачем проведено збір та аналіз літературних даних наукових ждерел, підготовлено статтю до друку)*
2. Нечаева ЯО, Грабчук СМ, Горшунов ЮВ, **Мотроненко ВВ**, Галкін ОЮ. Рекомбінантні білки терапевтичного призначення: особливості отримання, вивчення безпечності та ефективності (літературний огляд).

- Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки. 2017;2:85-93. *(Здобувач приймав участь в зборі та аналізі літерних даних наукових джерел)*
3. Galkin OYu, Lutsenko TM, Gorshunov YuV., **Motronenko VV**. Development of the method for microbiological purity testing of recombinant human interleukin-7-based product. Ukrainian Biochemical Journal. 2017;89(3):52-59. **(SCOPUS)** *(Здобувач приймав участь в аналізі отриманих результатів та підготовці статті до друку)*
  4. Луценко ТМ, Горшунов ВЮ, **Мотроненко ВВ**, Галкін ОЮ. Оцінка ризиків у технології препарату на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та її перспективна валідація. Наукові вісті НТУУ "КПІ". 2017;3:56-63. *(Здобувач приймав участь в аналізі отриманих результатів та підготовці статті до друку)*
  5. Сербов ВО, **Мотроненко ВВ**. Аналіз впливу механічних чинників при глибинному культивуванні мікроорганізмів. Innovative Biosystems and Bioengineering. 2019;3(1):45-51. *(Здобувач приймав участь в зборі та аналізі літерних даних наукових джерел, підготовці статті до друку)*
  6. Наточій ТО, **Мотроненко ВВ**. Порівняльна характеристика біотехнологічних підходів до отримання рекомбінантних цитокінів людини у бактеріальних системах експресії. Innovative Biosystems and Bioengineering. 2019;3(3):128-145. *(Здобувач приймав участь в зборі та аналізі літерних даних наукових джерел, підготував статтю до друку)*
  7. Grigorieva SM, Starosyla DB, Rybalko SL, **Motronenko VV**, Lutsenko TM, Galkin OYu. Effect of recombinant human interleukin-7 on *Pseudomonas aeruginosa* wound infection. Ukrainian Biochemical Journal. 2019;91(5):9-17. **(SCOPUS)** *(Здобувач приймала участь в аналізі літературних даних наукових джерел, плануванні та проведенні експериментів, обробці отриманих результатів, підготовці статті до друку)*
  8. **Motronenko V**, Lutsenko T, Galkin A, Gorshunov Y, Solovjova V. Optimization of the culture medium composition to increase the biosynthesis

of recombinant human interleukin-7 in *Escherichia coli*. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2020;9(4):761-768. (SCOPUS, Словаччина) (Здобувач приймала участь в аналізі літературних даних наукових джерел, плануванні та проведенні експериментів, обробці отриманих результатів, підготовці татти до друку)

Тези доповідей:

1. **Мотроненко ВВ**, Сербов ВО. Вплив перемішування при глибинному культивуванні мікроорганізмів. Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології: збірник наукових праць, випуск 3; 2017 жовт. 13; Харків. Х.: Вид-во НФаУ, 2017, с. 195-199.
2. **Мотроненко ВВ**. Вплив перемішування на рекомбінантні бактерії при глибинному культивуванні. XIII Miedzynarodowej naukowí – praktycznej konferencji, «Wykształcenie i nauka bez granic – 2017»; 2017 grud. 07-15; Przemyś. Przemyś, 2017, с. 70-72.
3. **Мотроненко ВВ**. Склад живильного середовища для культивування бактеріального продуценту рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини. Матеріали XIII Всеукраїнської науково-практичної конференції (для студентів, аспірантів і молодих учених) "Біотехнологія ХХІ століття"; 2019 квіт. 19; Київ. Київ 2019, с 53.
4. **Motronenko VV**. Analysis of the effects of hydrodynamic conditions in submerged culturing of recombinant bacteria. Матеріали XXVI Міжнародної науково-практичної конференції молодих учених та студентів "Topical issues of new medicines development". 2019 квіт. 10-12; Харк. Харків НФаУ 2019, с. 176-178.
5. **.Motronenko V**. Improvement of biotechnology for the production of recombinant interleukin-7. Матеріали 85 Ювілейної Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів "Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті", присвяченої 135-річчю Національного університету харчових технологій.

2019 квіт. 11-12; Київ. К.: НУХТ 2019, с. 523.

6. **Мотроненко ВВ.** Оптимізація складу живильного середовища для біосинтезу рекомбінантних білків у бактеріальних системах експресії. Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції-школи студентів та молодих учених "BIOMED Talks-2019". 2019 жовт. 15-17; Київ. Київ 2019, с. 88-89.
7. **Мотроненко ВВ,** Луценко ТМ. Оптимізація біотехнології отримання рекомбінантного інтерлейкіну-7 та його використання для лікування ранових інфекцій. VIII Міжнародна науково-практична онлайн конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії». 2019 лист. 15; Київ. Київ 2019, с.60-61.
8. **Motronenko V,** Lutsenko T, Rybalko S, Starosyla D, Hryhoreva S, Galkin O. Obtaining of recombinant human interleukin-7 and their use for the treatment of wound infections. Conference materials of the young scientists conference "Youth and modern problems of microbiology and virology". 2019 novem. 12-14; Kyiv. Kyiv 2019, p. 26.

## ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	18
ВСТУП.....	20
1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	26
1.1 Біологічна характеристика інтерлейкіну-7 людини.....	26
1.2 Біотехнологічні основи отримання рекомбінантних цитокінів людини у бактеріальних системах експресії.....	28
1.2.1 Характеристика бактеріальних систем експресії.....	29
1.2.1.1 <i>Escherichia coli</i> як один з найбільш поширених продуцентів рекомбінантних цитокінів.....	29
1.2.1.2 Інші прокаріотичні системи експресії.....	31
1.2.2 Характеристика процесу культивування рекомбінантних мікроорганізмів.....	34
1.2.2.1 Характеристика складу живильних середовищ для культивування рекомбінантних мікроорганізмів.....	34
1.2.2.2 Характеристика гідродинамічних умов культивування для отримання рекомбінантних білків.....	43
1.2.3 Методи виділення та очистки рекомбінантних цитокінів.....	48
Висновки до розділу 1.....	52
2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	55
2.1 Матеріали.....	55
2.1.1 Біологічні об'єкти.....	55
2.1.2 Реактиви та середовища.....	56
2.1.3 Лабораторне обладнання.....	57
2.2 Методи дослідження.....	58
2.2.1 Оптимізація кількісного складу живильного середовища.....	58
2.2.2 Приготування і оцінка рослинних екстрактів.....	59
2.2.3 Отримання ліпосомальних форм фітоекстрактів та вітаміну K <sub>1</sub> .....	60
2.2.4 Оцінка чистоти та біологічної активності pIL-7 <i>in vitro</i> .....	60

2.2.5 Оцінка впливу фітоекстрактів на <i>E. coli</i> .....	61
2.2.6 Дослідження біологічної активності рІЛ-7 <i>in vivo</i> .....	62
2.2.7 Визначення елімінації <i>P. aeruginosa</i> .....	62
2.2.8 Синтез імуноафінного сорбенту.....	63
2.2.9 Обробка експериментальних даних.....	64
3 ОПТИМІЗАЦІЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРЛЕЙКІНУ-7 ЛЮДИНИ.....	65
3.1 Оптимізація складу живильного середовища для культивування продуцента рІЛ-7.....	65
3.1.1 Оптимізація кількісного вмісту компонентів базового живильного середовища.....	65
3.1.2 Дослідження впливу рослинних екстрактів та вітаміну К <sub>1</sub> на рівень біосинтезу рІЛ-7.....	75
3.2 Дослідження механізмів впливу рослинних екстрактів на біосинтетичну активність продуцента рІЛ-7.....	83
3.3 Розробка методу імуноафінної хроматографії для очистки рІЛ-7.....	86
Висновки до розділу 3.....	93
4 ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРЛЕЙКІНУ-7 ЛЮДИНИ НА ПЕРЕБІГ РАНОВОЇ ІНФЕКЦІЇ.....	97
Висновки до розділу 4.....	103
5 РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ СУБСТАНЦІЇ ІНТЕРЛЕЙКІНУ-7 ЛЮДИНИ ТА ЇЇ СТАНДАРТИЗАЦІЯ.....	105
5.1 Технологія субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини.....	106
5.2 Оцінка ризиків виробничого процесу отримання субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини.....	127
Висновки до розділу 5.....	136
6 ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНА ОЦІНКА ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРЛЕЙКІНУ-7 ЛЮДИНИ.....	137
6.1 Розрахунок потреби населення у препаратах ІЛ-7.....	137
6.2 Розрахунок виробничої потужності.....	138



6.3 Розрахунок ефективного фонду робочого часу цеху.....	139
6.4 Аналіз техніко-економічних показників.....	140
6.5 Розрахунок собівартості продукту і вартості проекту.....	140
6.5.1 Розрахунок вартості сировини, матеріалів та напівфабрикатів.....	141
6.5.2 Розрахунок вартості палива та енергії.....	141
6.5.3 Розрахунок заробітної плати виробничих працівників.....	144
6.5.4 Розрахунок витрат на утримання та експлуатацію обладнання.....	146
6.5.5 Розрахунок цехових витрат.....	147
6.5.6 Розрахунок собівартості продукції.....	151
6.6 Розрахунок собівартості субстанції рІЛ-7 для курсу лікування.....	151
Висновки до розділу 6.....	153
ВИСНОВКИ.....	154
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	156
ДОДАТОК А.....	174
ДОДАТОК Б.....	175
ДОДАТОК В.....	176

## СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

EDTA	– етилендіамідтетраоцтова кислота
АТС	– апаратурно-технологічна схема
АФІ	– активний фармацевтичний інгредієнт
ДЕФ	– дробовий факторний експеримент
ДР	– допоміжні роботи
ДТТ	– дітіотрієтол
ДФУ	– Державна фармакопея України
ЖС	– живильне середовище
ЗВ	– знешкодження відходів
ІАК	– імуноафінна колона
ІІ-7	– інтерлейкін-7 людини
ІФА	– імуноафінний аналіз
ІФН	– інтерферон
ККТ	– критична контрольна точка
КСФ	– колонієстимулюючий фактор
мАт	– моноклональні антитіла
МНПК	– мононуклеарні клітини периферичної крові
МПА	– м'ясо-пептонний агар
ОГ (OD)	– оптична густина
ПААГ	– поліакриламідний гель
ПАР	– поверхнево-активна речовина
ПВ	– переробка відходів
ПЕГ	– поліетиленгліколь
рІІ-7	– рекомбінантний інтерлейкін-7 людини
СФХ	– соєвий фосфатидилхлорин
ТЕОС	– тетратоксианін
ТП	– технологічний процес
ТС	– технологічна схема

ТФР	– трансформуючий фактор росту
ФНП	– фактор некрозу пухлин
ФСБ	– фосфатно-сольовий буферний розчин
ЦФР	– цитратно-фосфатний буферний розчин

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Наразі спостерігається стрімкий прогрес усіх галузей науки та промисловості, що застосовують високі технології і, в першу чергу, біотехнології. Біотехнологія базується на використанні знань і методів біохімії, мікробіології, генетики і хімічної технології, що дає змогу діставати користь у технологічних процесах із властивостей мікроорганізмів та клітинних культур. Що стосується більш сучасних біотехнологічних процесів, то вони базуються на методах рекомбінантних ДНК [1].

Одним з напрямів сучасної біотехнології є імунобіотехнологія, яка формувалася в останні два десятиріччя і має на меті цілеспрямований біосинтез нових біологічно активних препаратів та фармацевтичних продуктів, до яких належать моноклональні антитіла, вакцини, сироватки, цитокіни, діагностичні засоби, імуномодулятори та пробіотики [1].

Інтерлейкін-7 людини (ІЛ-7) – лімфопоетичний фактор росту, який займає особливе положення серед інших цитокінів через його унікальну функцію в гематопоезі, що не дублюється іншими факторами. Відсутність функціонального ІЛ-7 може бути однією з причин важкого комбінованого імунодефіциту. ІЛ-7 відіграє важливу роль в дозріванні та розмноженні клітин лімфоїдного ряду: результатом відсутності функціонального ІЛ-7 в організмі є лімфопенія та, як наслідок, важкий імунодефіцит. Клітинами-мішенями для ІЛ-7 є кістково-мозкові попередники лімфоцитів, зрілі Т-лімфоцити, тимоцити, моноцити. При збільшенні кількості ІЛ-7 рівень В- і Т-лімфоцитів в крові підвищується. ІЛ-7 бере участь у формуванні лімфовузлів. Основними продуцентами ІЛ-7 є стромальні клітини кісткового мозку та тимуса, а також деякі інші клітини організму людини [2-3].

Наявні дані свідчать про можливість використання ІЛ-7 в комплексній терапії при лікуванні вірусних та бактеріальних інфекцій [4-7]. ІЛ-7 розглядається й як засіб для лікування низки онкологічних захворювань (зокрема, таких як гліома, меланома, гліобластома, рак передміхурової залози) [8].

Біологічний потенціал ІЛ-7 дозволяє вважати, що його використання може стимулювати імунітет у пацієнтів з лімфоцитарним виснаженням (у т.ч. на тлі хронічних інфекційних захворюваннях), аутоімуними захворюваннями тощо. На сьогоднішній день ведуться активні дослідження ІЛ-7 як засобу для відновлення імунної системи людей, які перенесли трансплантацію кісткового мозку, високоактивну антиретровірусну терапію, хіміотерапію, а також як засобу при аутоімуних захворюваннях.

Зважаючи на сучасні досягнення молекулярної біології та біотехнології у галузі отримання білків медичного призначення найбільш перспективним видається підхід до отримання ІЛ-7 на основі рекомбінантного продуцента [3, 9-10]. Оптимізація процесів біосинтезу рекомбінантних продуктів медичного призначення є актуальною задачею біотехнології, особливо з позицій техніко-економічних показників, оскільки вихід цільових продуктів, особливо при застосуванні багатоетапних складних процедур виділення та очистки білків, впливає на вартість отримуваних медичних препаратів та, відповідно, на їх соціальну доступність. Один із напрямків підвищення виходу рекомбінантних продуктів у бактеріальних системах біосинтезу адресований до оптимізації складу поживних середовищ. Особлива увага при розробці сучасних технологій отримання рекомбінантних білків приділяється удосконаленню способів виділення та очистки цільового продукту.

Таким чином, розробка біотехнології отримання рекомбінантного інтерлейкіну-7 (рІЛ-7) людини є перспективним завданням сучасної біотехнології, актуальність якого для нашої країни є ще більшою, оскільки імпорتنі аналоги, що мають заявитися на фармацевтичному ринку найближче десятиліття, будуть, вочевидь, недоступними для широких верств населення через високу вартість.

**Зв'язок роботи з науковими програмами.** Дисертація виконана на кафедрі промислової біотехнології та на кафедрі трансляційної медичної біоінженерії КПІ ім. Ігоря Сікорського в рамках наступних науково-дослідних робіт: «Науково-методичне обґрунтування принципів стандартизації

біофармацевтичної продукції та організації її виробництва» (державний реєстраційний № 0116U007718) та «Розробка інноваційних біомедичних технологій та продуктів для діагностики та лікування патологій людини» (державний реєстраційний № 0119U103789).

**Мета та задачі дослідження.** *Мета роботи* – наукове обґрунтування біотехнології отримання субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини.

Для досягнення поставленої мети були поставлені *задачі*.

1. Оптимізувати кількісний та якісний склад живильного середовища для біосинтезу рІЛ-7 бактеріями *E. coli*.

2. Дослідити можливість підвищення біосинтетичної активності мікробного продуцента рІЛ-7 за рахунок додавання до живильного середовища рослинних екстрактів та вітамінів, у звичайній й у ліпосомальній формах.

3. Розробити високоспецифічну імуноафінну методику очистки рІЛ-7.

4. Дослідити ефективність застосування рІЛ-7 для лікування ранових інфекцій в експерименті.

5. Розробити технологічну та апаратурну схеми отримання субстанції рІЛ-7 людини й провести оцінку ризиків виробничого процесу.

6. Провести техніко-економічну оцінку розробленої технології отримання рІЛ-7.

*Об'єкт дослідження* – біотехнологічні основи отримання субстанції рІЛ-7 та науково-методичні принципи стандартизації їх виробництва.

*Предмет дослідження* – оптимізація процесу біосинтезу рІЛ-7, удосконалення технології очистки рІЛ-7, імуномодулююча активність рІЛ-7 *in vivo*, апаратурно-технологічна реалізація виробничого процесу отримання субстанції рІЛ-7 та аналіз його ризиків.

*Методи дослідження* – біотехнологічні, мікробіологічні, біохімічні, фізико-хімічні, математичні та графоаналітичні.

**Наукова новизна отриманих результатів.**

Оптимізовано склад живильного середовища для біосинтезу рІЛ-7 бактеріями *E. coli* (вихід – 0,95мг/мл) із високою біологічною активністю *in vitro*

та *in vivo*, що дозволило підвищити вихід рІЛ-7 у 1,3 рази у порівнянні із базовою технологією.

Показано стимулюючу дію екстрактів клівії кіноварної і зефірантесу великоквіткового (0,5-1,0%) та ліпосомальної форми вітаміну К<sub>1</sub> (15-25мг/мл) як стимулюючих добавок до живильного середовища (приводить до збільшення виходу цільового продукту у 1,69 рази).

Біологічно активні речовини досліджених фітоекстрактів взаємодіють з поринами зовнішньої мембрани *E. coli*, що, ймовірно, є причиною підвищення біосинтетичної активності рекомбінантного продуцента.

Показано, що застосування рІЛ-7 (5мкг рІЛ-7 на добу внутрішньочеревно, щодня до загоєння рани) прискорює швидкість загоєння ран у дослідних тварин та елімінації *Pseudomonas aeruginosa* із них.

Результати роботи доповнили сучасні науково-методичні підходи створення препаратів рекомбінантних білків терапевтичного призначення.

**Практичне значення отриманих результатів.** Розроблено технологічну та апаратурну схему отримання субстанції рІЛ-7 та проведено аналіз критичних точок виробничого процесу.

Розроблену технологію отримання субстанції рІЛ-7 апробовано у відділі регуляторних відносин, менеджменту якості та науково-технічних розробок ТОВ «УА «ПРО-ФАРМА» (м. Київ) (Додаток А).

Результати роботи впроваджено у навчальний процес у КПІ ім. Ігоря Сікорського, а саме: у викладання курсу «Медична біотехнологія» для студентів спеціальності 163 – Біомедична інженерія на кафедрі трансляційної медичної біоінженерії (Додаток Б) та курсу «Медична біотехнологія-2. Імунобіотехнологія» для студентів спеціальності 162 – Біотехнології та біоінженерія на кафедрі промислової біотехнології (Додаток В).

**Особистий внесок здобувача.** Результати роботи, які викладено в дисертації, одержані автором особисто або за його безпосередньої участі. Планування експериментальної роботи проводилися спільно із науковими керівниками.

Оптимізацію процесу біосинтезу та очистки рІЛ-7 проводили спільно з к.т.н. Т.Н. Луценко, к.т.н. Ю.В. Горшуновим, а вивчення впливу рослинних екстрактів та вітаміну К на ефективність біосинтезу – спільно з к.б.н., с.н.с. В.Ф. Соловйовою. Вивчення біологічної активності рІЛ-7 *in vivo* проводили спільно із д.м.н., проф. С.Л. Рибалко, к.б.н. Д.Б. Старосилою, к.б.н. С.М. Григор'євою. Огляд літератури за окремими розділами проводили спільно з к.т.н. Т.М. Луценко, Я.О. Начаєвою, С.М. Грабчук, Т.О. Наточій, С.В. Сербовим.

Особисто автором описані результати досліджень, проведено їх аналіз та обговорення. Спільно із науковими керівниками сформовано висновки.

Автор висловлює щирю вдячність науковим керівникам за підтримку та цінні поради під час планування й виконання роботи.

**Апробація результатів роботи.** Основні положення роботи доповідались та обговорювались на: XXVI Міжнародній науково-практичній конференції молодих учених та студентів «Topical issues of new medicines development» (10-12 квітня 2019 р., м. Харків), 85-й Ювілейній Міжнародній науковій конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (11-12 квітня 2019 р., м. Київ), XIII Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів і молодих учених «Біотехнологія XXI століття» (19 квітня 2019 р., м. Київ), 14-му Форумі з актуальних питань вроджених вад серця «Регенеративна медицина» (1-2 жовтня 2019 р., м. Київ), Міжнародній конференції для студентів медиків та молодих вчених «BioMedTalts 2019» (15-17 жовтня 2019 р., м. Київ), Науково-практичній конференції молодих дослідників «Молодь та сучасні проблеми мікробіології і вірусології» (12-14 листопада 2019 р., м. Київ), VIII Міжнародній науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (15 листопада 2019 р., м. Київ).

**Публікації.** За темою дисертаційної роботи опубліковано 16 праць: 1 стаття у періодичному науковому фаховому виданні держави, яка входить до Організації економічного співробітництва та розвитку та Європейського Союзу



(Словаччина), та яке цитується у науково-метричній базі SCOPUS; 6 статей у наукових виданнях, включених до переліку наукових фахових видань України, у т.ч. 2 статті у виданнях, що цитуються у науково-метричній базі SCOPUS; 1 стаття в фахових виданнях інших країн, 8 тез доповідей.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, їх аналізу та обговорення (4-ох розділів), висновків, списку використаних джерел (163 найменування), 3 додатків. Робота представлена на 176 сторінках друкованого тексту, містить 21 рисунок і 28 таблиць.

## 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Біологічна характеристика інтерлейкіну-7 людини

Цитокіни являють собою низькомолекулярні білки або глікопротеїни, що секретуються багатьма різними типами клітин. Як сигнальні молекули цитокіни забезпечують зв'язок між клітинами і відіграють вирішальну роль в модуляції вродженої та адаптивної імунної відповіді. Вони є розчинними медіаторами, які активні в дуже невеликих кількостях та впливають майже на кожен біологічний процес: ембріональний розвиток, патогенез захворювання, неспецифічну відповідь на інфекцію, специфічну відповідь на антигени та зміни когнітивних функцій. Сімейство цитокінів включає інтерферони (ІФН) інтерлейкіни (ІЛ), хемокіни, сімейство факторів некрозу пухлин (ФНП), колонієстимулюючі фактори (КСФ) та інші [11-16].

Відомо більше 40 інтерлейкінів з різними властивостями, які класифікуються на підставі гомології послідовностей, властивостей рецепторів, біологічних функцій та походження. Вони синтезуються лейкоцитами, мононуклеарними фагоцитами та іншими тканинами організму людини [11].

Інтерлейкін-7 – це один із центральних цитокін імунної системи, який відіграє важливу роль у модуляції Т- і В-клітинного розвитку і Т-клітинного гомеостазу [17-19], лімфопоетичний фактор росту, який у людини кодується однойменним геном та не дублюється іншими факторами росту в її організмі. Відноситься до цитокінів першого типу родини гемапоетину [2] та входить до суперсімейства інтерлейкіну-2 [20].

Вперше ген ІЛ-7 був клонований у мишей в 1988 році [21], а у людини – в 1989 році [22]. Ген, що кодує ІЛ-7, знаходиться в довгому плечі 8-ої хромосоми, а гомологія між ІЛ-7 у людини і мишей складає 81%. Довжина білка складається з 177 амінокислотних залишків (рис. 1.1). Розрахункова молекулярна маса цитокіну складає близько 20кДа, проте він піддається інтенсивному глікозилюванню після

чого реальна молекулярна маса досягає близько 25кДа [23]. Коефіцієнт молярної екстинкції ІЛ-7 – 7690, ізоелектрична точка – 8,52, заряд при рН7 складає 3,51 [3].

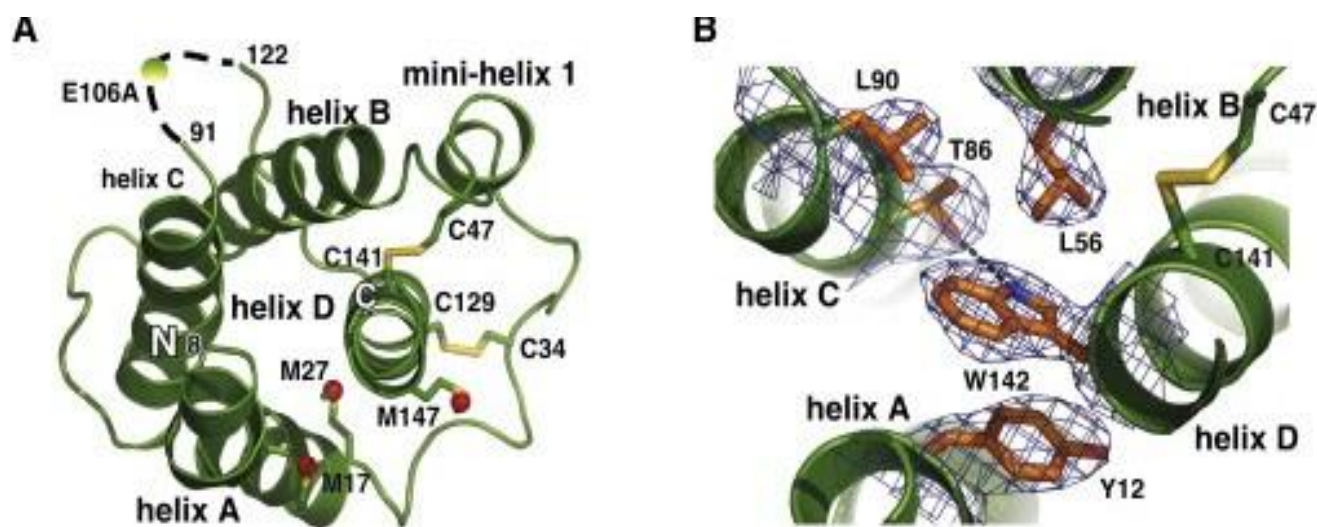


Рисунок 1.1 – Структурна модель неглікозильованого ІЛ-7 [24]:

А) тривимірна модель молекули ІЛ-7; В) гідрофобне ядро ІЛ-7

Було виявлено, що ІЛ-7 впливає на синтез В-клітин, проте механізм даного впливу на сьогоднішній час достеменно не вивчено. Досліди на мишах показали, що введення ІЛ-7 здоровим особам призводить до збільшення пре-В-клітин та зрілих В-клітин, а введення його мишам з дефіцитом лімфоцитів сприяє саме синтезу зрілих В-клітин. Проте, для людини дана стимулююча дія доведена не була [4]. Існують роботи, які описують затримку дозрівання В-клітин у інфікованих Вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ) [5] та сприяють апоптозу В-клітин [4].

Т-клітини в основному утворюються в тимусі, проте, авторами [6] було встановлено, що при наявності ІЛ-7 вони можуть розвиватися і в кишечнику, що підтверджують досліді *in vitro* [7]. Існують досліді, які показують що ІЛ-7 затримує синтез Т-клітин у ВІЛ-інфікованих [25], проте, більш ранні роботи, показували, що він навпаки сприяє відновленню Т-клітин [26], тому дане питання, потребує додаткового вивчення. Також встановлено, що ІЛ-7 відіграє регуляторну роль у апоптозі, сприяючи відновленню зрілих Т-клітин [4].

Було виявлено, що ІЛ-7 має протипухлинний ефект при лікуванні таких пухлин як гліома, меланома, лімфома, лейкоз, гліобластома та раку простати. Також, встановлено, що він підсилює протипухлинний ефект інтерферону- $\gamma$  при лікуванні гліоми у криси [8]. Однак, при лікуванні недрібноклітинного раку легень спостерігається протилежний ефект – ІЛ-7 стимулює розвиток захворювання, можливо, такий ефект можна пояснити його апоптозними властивостями. Достеменно, вплив ІЛ-7 та механізм цього впливу залишається на сьогоднішній день невідомим і потребує ретельного вивчення [4].

Потенціал і широкий спектр ефектів дає змогу припустити, що використання ІЛ-7 зможе стимулювати імунітет у пацієнтів з лімфоцитарним виснаженням, автоімунними захворюваннями тощо. Наразі ведуться активні дослідження ІЛ-7 як засобу для відновлення імунної системи на фоні імунодефіцитних станів різного походження [17-19]. Показано його терапевтичну активність при солідних пухлинах, бактерійних та вірусних інфекціях [23, 27-29].

## **1.2 Біотехнологічні основи отримання рекомбінантних цитокінів людини у бактеріальних системах експресії**

Розвиток біотехнології тісно пов'язаний з використанням рекомбінантних мікроорганізмів, в які методами генної інженерії виживлено чужорідну ДНК, що відповідає за синтез певного метаболіту. Технологія рекомбінантних ДНК дала можливість створювати продуценти для крупномаштабного синтезу багатьох біологічно активних речовин, а також отримувати продукти з покращеними властивостями або в більшій кількості. До мікроорганізмів, що використовуються при створенні рекомбінантних штамів висувається ряд вимог, серед яких відсутність патогенності і токсичності, а також можливість культивування на простих поживних середовищах. Найчастіше для створення рекомбінантних мікроорганізмів використовують різноманітні бактерії родів *Bacillus*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Escherichia coli*, та мікроскопічні гриби *Saccharomyces cerevisiae* [30, 31].

## 1.2.1 Характеристика бактеріальних систем експресії

### 1.2.1.1 *Escherichia coli* як один з найбільш поширених продуцентів рекомбінантних цитокінів

У виробництві рекомбінантних білків найчастіше використовується саме *Escherichia coli* як продуцент з найкращими техніко-економічними показниками. Було описано приклади успішної експресії багатьох цитокінів та факторів росту, таких як людський ІЛ-21 (100мг/л) та людський ІЛ-38 (46,8мг/л), за допомогою *E. coli*. Рекомбінантні терапевтичні засоби, отриманні завдяки системі експресії *E. coli*, становлять майже 40% від інших рекомбінантних терапевтичних препаратів на ринку [32-34].

Переваги *E. coli* як системи експресії наступні: прості харчові потреби продуцента, які можуть бути задоволені простими та дешевими поживними середовищами визначеного складу; прості умови культивування, більшість параметрів якого можна змінювати для оптимізації експресії білка; простота маніпуляцій з геномом порівняно з іншими мікроорганізмами, трансформація екзогенною ДНК відбувається швидко і легко, плазмідну трансформацію *E. coli* можна провести всього за 5 хв; висока швидкість росту; культивування з високою щільністю клітин (понад 100кг/м<sup>3</sup>); наявність і доступність багатьох різних векторів клонування (плазміда, вірус, фаг) і мутантних штамів-хазяїнів; високі продуктивність та вихід продукту; простота масштабування та дешевизна; велика кількість інформації та хороша вивченість генетичних, молекулярно-біологічних, біохімічних та фізіологічних властивостей *E. coli* [32, 35-43].

Незважаючи на доведену ефективність, виробництво рекомбінантних білків з використанням *E. coli* має ряд недоліків, а саме: нездатність до ефективного продукування дуже довгих або коротких білків; нездатність до здійснення складних посттрансляційних модифікацій; утворення неправильно складеного або агрегованого білка; утворення цільового білка – неактивного, нерозчинного, який потребує рефолдингу – у вигляді тілець включення; наявність у бактерії

пірогенів та ендотоксинів, які повинні бути повністю виключені з білків, які вводяться тваринам або людям; проблеми з експресією «токсичних» генних продуктів, які можуть бути токсичними для бактерії-хазяїна; висока щільність клітин може призвести до утворення токсичного ацетату, однак цього можна уникнути, контролюючи рівень кисню; низькі рівні експресії, що можуть бути також обумовлені деградацією білка, неефективною трансляцією або використанням еукаріотичного кодону, який не є оптимальним для *E. coli* [32, 35-43].

Для продукування будь-якого рекомбінантного білка важливим фактором є вибір штаму-продуцента. Даний штам повинен мати дефіцит природних протеаз, стабільно підтримувати експресію плазміди і надавати генетичні елементи, що відносяться до системи експресії. Як правило, використовують штами *E. coli* В і K12, найчастіше – штам *E. coli*: BL21 (DE3) і деякі похідні лінії K12 [36, 41, 44, 45].

Штам *E. coli* В був спроектований і розроблений Studier і Moffatt [46] та використовувався, як модельний штамом для вивчення фагової чутливості, систем рестрикції-модифікації, бактеріальної еволюції та експресії рекомбінантного білка в лабораторіях і на підприємствах біотехнологічній промисловості [46]. Потім штам В був модифікований, а на його основі сконструйовано ряд додаткових штамів, таких як BL21, C41 і C43, які мають різні можливості для експресії різних типів білків. В-штам і його похідні мають ряд переваг, зокрема низьке накопичення ацетату при високих концентраціях глюкози в середовищі, дефіцит специфічних протеаз, які розщеплюють чужорідні білки та перешкоджають їх виділенню, і висока проникність зовнішньої мембрани, що робить їх бажаними реципієнтами для експресії терапевтичних білків [47].

Штам BL21 (DE3) є одним із широко використовуваних штамів для перевірки експресії основного білка в *E. coli*. Вбудований в хромосому профаг  $\lambda$ DE3 експресує ген T7 РНК-полімерази під контролем промотору *lacUV5*. У похідних BL21 відсутні протеази Lon та *OmpT*, що стабілізує експресію деяких рекомбінантних білків. При використанні цього штаму існує ймовірність

експресії з нечітким вираженням ген, яку можна зменшити додаванням 1% глюкози до поживного середовища [45, 48]. Рівень експресії може бути поліпшений для токсичних білків з використанням штаму, що містить плазмиду pLysS (BL21 (DE3) pLyS), і для глобулярних і мембранних білків з використанням штамів C41 (DE3) і C43 (DE3). Покращена експресія токсичних білків і подолання проблеми нестабільності при цьому плазмід може бути досягнута і в штаммах C41 (DE3) і C43 (DE3) [36, 49].

Штам *E. coli* K12 і його похідні також використовуються в біотехнологічній промисловості для виробництва рекомбінантних терапевтичних засобів [47]. Тіоредоксинредуктазні (*trxB*) мутанти AD494 і Origami (додатково глутатіонредуктазний (*gor*) мутант) здатні підвищувати утворення дисульфідних зв'язків у білках завдяки більш окислювальному середовищу в цитоплазмі, що забезпечує потенціал для отримання правильно складених активних білків. Інший штам лінії K12 – це HMS174, *recA*-мутант, який позитивно впливає на стабільність плазмиди [36, 45].

### 1.2.1.2 Інші прокаріотичні системи експресії

Іншими використовуваними бактеріальними системами експресії для виробництва рекомбінантних цитокінів є грампозитивні бацили. Переваги використання систем на основі мікроорганізмів роду *Bacillus* наступні: високий рівень секреції без участі внутрішньоклітинних тілець включення; легкість маніпуляцій з організмом; добре охарактеризовані системи в плані генетики; наявність високорозвинених технологій трансформації та заміни генів; високі ростові характеристики культур; метаболічна міцність; на відміну від *E. coli*, *B. subtilis* загально визнана безпечною (статус GRAS від FDA), містить низьку концентрацію пірогенів; ефективно та економічно вигідне виділення продукту. Деякі з цих переваг присутні тільки у промислових штаммах, які часто недоступні для академічних дослідників. Крім того, геноми *B. subtilis* і *B. licheniformis* були просеквеновані, і не було виявлено продукування ними шкідливих екзо- або

ендотоксинів. Секреція бажаних білків у ферментаційне середовище не вимагає складної подальшої обробки культуральної рідини, зокрема виключає необхідність руйнування клітин або технологій хімічної обробки, що робить процес виділення продукту відносно ефективним і економічним [38, 40].

Як правило, для експресії використовуються види *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* і *B. brevis*. Вони не мають зовнішньої оболочки, що містить ліпополісахариди і притаманна грамнегативним бактеріям. Промислові штами *B. subtilis* мають високий рівень секреції продуктів, а штами-хазяїни, що використовуються для успішної експресії рекомбінантних білків, часто позбавляють генів *amyE*, *aprE*, *nprE*, *spoIIAC*, *srfC* і трансформують за допомогою природного компетентності. Вихід білка в системі експресії *Bacillus* досягає 3г/л.

Проблемою використання *B. subtilis* є синтез ними багатьох протеаз, які іноді руйнують рекомбінантні білки. Для експресії гетерологічних генів був створений штам *B. licheniformis*, дефіцитний за екзопротеазами. Він є аспорогенним і має високий рівень позаклітинної експресії з мінімальними втратами продукту внаслідок протеолізу після секреції. Для отримання більш генетично стабільної системи після трансформації і для підвищення рівня виробництва, був видалений також ген  $\alpha$ -амілази [38, 40]. Дана система виявилась найкращою, тому що білок синтезується в середовище, звідки його набагато легше очищати, ніж з маси клітин після центрифугування; сигнальний пептид відділяється від цільового білка коректно і без ускладнень; не виявлено явних ознак токсичності білка; достатньо високий рівень продукції ІЛ-3, що дозволяє вивести процес на комерційно доступний масштаб виробництва [50]. *B. brevis* також використовується для експресії гетерологічних генів завдяки значно нижчій активності протеази і синтезу інгібітора протеїнази [40].

Серед бактеріальних систем експресії особливої уваги заслуговують також системи на основі мікроорганізмів роду *Streptomyces*. Як грампозитивні бактерії *Streptomyces* виділяють велику кількість розчинних білків до поживного середовища, що свідчить про високу здатність їхніх систем секреції. Це дійсно одна з найважливіших ознак, яка протягом останнього десятиліття приваблює



багатьох дослідників. Для використання в якості хостів перевагу надають кільком видам, особливо *S. lividans* завдяки відсутності рестрикційних систем і низькій ендогенній протеолітичній активності. *S. lividans* використовують для виробництва гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактора людини Leucotropin<sup>TM</sup> (Cangene Corporation, Winnipeg, Canada), який успішно пройшов третю фазу випробувань, і багатьох інших рекомбінантних білків, зокрема IL-1 $\beta$  з виходом продукту  $3,8 \times 10^{12}$  од/м<sup>3</sup>, IFN- $\alpha$ 1 –  $1,2 \times 10^5$  од/мл, IL-2 –  $0,03 \cdot 10^{-3}$  кг/м<sup>3</sup>, TGF- $\alpha$  –  $10 \cdot 10^{-3}$  кг/м<sup>3</sup>. Потенційними сферами для покращення системи експресії *Streptomyces* є ідентифікація сильних індукованих промоторів для підвищення виходу продукції та розділення фаз росту і синтезу, а також покращення швидкості трансляції шляхом вирішення проблем з рідкісним кодоном [51, 52].

Види роду *Pseudomonas* відомі своїм швидким ростом і здатністю секретувати білків. Було показано, що кілька видів *Pseudomonas*, зокрема *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* і *P. putida*, є хорошими альтернативами *E. coli* у виробництві рекомбінантних білків завдяки такому ж або вищому виходу продукту, порівняно з *E. coli*. До сучасної платформи для виробництва рекомбінантного білка з використанням *P. fluorescens* належить сімейство хостів, отриманих з *P. fluorescens* біовару I (MB101), і стабільні, здатні до самостійної реплікації, але некон'югативні плазмідні з різною кількістю копій. В порівнянні з *E. coli* *P. fluorescens* також здатна до гіперпродукції рекомбінантних білків (> 50% від усіх білків клітини) та росту до високої щільності клітин (> 100 кг/м<sup>3</sup>). Однак синтез рекомбінантних протеїнів у *P. fluorescens* менш залежний від концентрації кисню, а в процесі культивування відсутнє накопичення ацетату, тому суворий контроль аерації та/або концентрації глюкози не вимагається. *P. fluorescens* може секретувати білки до позаклітинного середовища або до периплазматичного простору. Експресія гетерологічних генів здійснюється за допомогою промоторів різної сили, таких як *tac* і *lacUV5*, отриманих з *E. coli*. Розроблено також кілька ендогенних промоторів *P. fluorescens*. [51, 53].

## **1.2.2 Характеристика процесу культивування рекомбінантних мікроорганізмів**

Наявність в рекомбінантних штаммах мікроорганізмів чужорідної ДНК підвищує їх чутливість до умов культивування. Тому, необхідно знайти оптимальне співвідношення між всіма параметрами процесу, забезпечивши стабільність продуцентів в умовах метаболічного перевантаження клітин та нестабільності їх популяції. Рівень експресії рекомбінантного білку визначається умовами культивування (швидкість перемішування, температура, рН, рівень аерації), складом поживного середовища та якістю посівного матеріалу [54].

Процес біосинтезу здійснюється в ферментерах, які оснащені засобами для контролю параметрів, котрі впливають на ріст клітин продуценту, а також на експресію білка. Ці параметри включають рН, температуру, швидкість перемішування, концентрацію розчиненого кисню і, головне, дозування поживних речовин. Для культивування бактерій використовують періодичний, періодичний з підживленням і безперервний способи. Найчастіше використовують перший спосіб, який дозволяє отримати велику кількість біомаси за короткий термін. Проте, такі процеси доцільно застосовувати тільки тоді, коли необхідна мала кількість рекомбінантних білків для детекції або лабораторних досліджень вакцин чи інших терапевтичних засобів. Культивування з підживленням та безперервне культивування використовується, коли передбачена складна багатоступенева очистка і для виділення цільового продукту необхідна велика кількість біомаси [36].

### **1.2.2.1 Характеристика складу живильних середовищ для культивування рекомбінантних мікроорганізмів**

Отримання інокуляту та основну ферментацію проводять шляхом вирощування продуцента на простому середовищі, яке є оптимальним для забезпечення максимальної кількості цільового продукту на виході [35].

Середовища для культивування рекомбінантних мікроорганізмів, з метою досягнення оптимальної щільності клітин повинні містити такі важливі компоненти, як джерело вуглецю та азоту, солі, мінерали та деякі фактори росту. Загалом, використовуються три типи середовищ: синтетичні, напівсинтетичні та природні (натуральні). Як правило, синтетичні середовища містять глюкозу як джерело вуглецю, сульфат амонію та/або хлорид амонію як джерело азоту, поряд із сульфатом магнію і фосфатними солями. Напівсинтетичні середовища містять глюкозу або гліцерин як джерело вуглецю, дріжджовий екстракт та/або триптон як комплексне джерело азоту, поряд із сульфатом магнію і фосфатами. Компоненти середовища, такі як гліцерин, можуть збільшувати ріст клітин і вихід рекомбінантного білка. Додавання двовалентних катіонів (сульфат магнію) забезпечують кращий ріст клітин і вищий вихід білка. Дріжджовий екстракт у середовищі культивування також значно підвищує продукцію білка. Фосфатні солі в поживних середовищах забезпечують буферну здатність, запобігаючи коливанню значення рН, яке може негативно вплинути на нормальну метаболічну активність. Для хорошого росту культури, а також високого виходу рекомбінантного білка концентрація кожного компонента повинна бути чітко визначена: поживне середовище має містити не тільки всі необхідні компоненти, але й оптимальні їх концентрації для уникнення інгібування росту культури. Наприклад, висока концентрація глюкози викликає накопичення ацетату і призводить до зниження концентрації продукту [36, 47].

Для культивування штаму *E. coli*, одного з найпоширеніших продуцента рекомбінантних цитокінів, можливе застосування одного зі стандартних середовищ, які зазвичай використовуються для вирощування бактерій, наприклад: середовище Luria-Bertani (LB) (1% триптону, 0,5% дріжджового екстракту і 1% NaCl); 2YT (1,7% бактотриптону, 1% дріжджового екстракту і 0,5% MgSO<sub>4</sub>); SOB (2% бактотриптону, 0,5% дріжджового екстракту, 0,5% NaCl, 0,25% KCl, 1% MgCl<sub>2</sub>, 1% MgSO<sub>4</sub>); SOC (2% бактотриптону, 0,5% дріжджового екстракту, 0,2% NaCl, 0,25% KCl, 1% MgCl<sub>2</sub>, 1% MgSO<sub>4</sub>, 20·10<sup>-3</sup>М глюкози); GYT (0,25% триптону, 0,125% дріжджового екстракту, 10% гліцеролу); Terrific broth

(ТВ) (24г/л дріжджового екстракту, 12г/л бактотриптон, 4мл гліцеролу, 100мл фосфатного буферу (0,17М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 0,72М  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )); Super broth (SB) (32г/л триптон, 20г/л дріжджового екстракту, 5г/л NaCl) [35-38, 55-58]. Найбільш вживані середовища для культивування певних цитокінів наведено в таблиці 1.1.

Для культивування рекомбінантного штаму *E. coli* BL21(DE3) для отримання рекомбінантного інтерферону- $\beta$  людини, використовували наступні поживні середовища. Одиночну колонію бактеріальних клітин з чашки Петрі інокулювали в 10мл середовища LB, що містить 50мкг/мл карбеніциліну, й інкубували протягом ночі при 37°C (200об/хв). Потім цей преінокулят внесли в 250мл середовища Terrific broth. Після досягнення ним специфічної оптичної густини  $\text{OD}_{600} \sim 2$  інокулят внесли в біореактор, що містив 2л середовища ТВ і з додаванням карбеніциліну. Експресію білка rhIFN- $\beta$  індукували 1мМ IPTG, коли  $\text{OD}_{600}$  культуральної рідини досягла  $\sim 0,6$ . Клітини вирощували протягом 8 год [69].

У роботі [74] досліджували вплив стимулюючих добавок до складу поживного середовища при культивуванні рекомбінантного штаму *E. coli* продуценту фактору некрозу пухлин (ФНП- $\alpha$ ). В результаті дослідів встановили, що додавання 2% гліцину збільшило ефективність реакції зв'язування з TAG72 в 14 раз, додавання 1% тритону X-100 – в 38 раз. А при додаванні 1% тритону X-100 та 2% гліцину в комплексі ефективність реакції зв'язування збільшилася в 170 раз.

При дослідженні впливу складу середовища для автоіндукції цільового білка (ІЛ-7 людини) рекомбінантним штамом *E. coli* BL21 (DE3), було встановлено що якісний склад мінеральних солей може суттєво впливати на процес біосинтезу [64]. Зокрема, відсутність у складі поживного середовища гідрокарбонату натрію призводить до зменшення виходу цільового білку з 0,9мг/мл до 0,6мг/мл, а сульфату магнію – до 0,5мг/мл. При відсутності у складі поживного середовища дигідрофосфату калію вихід ІЛ-7 знижується в три рази до 0,3мг/мл. Аналогічні результати спостерігалися і при збільшенні кількості лактози в двічі у складі поживного середовища [64].

Таблиця 1.1 – Аналіз умов культивування мікроорганізмів – продуцентів рекомбінантних цитокінів

Продукт, його локалізація, вихід	Опис генетичної конструкції	Склад живильного середовища	Опис режиму культивування	Джерело
<b>ІЛ-2</b> , ендогенно, 8-14г клітин на 1л поживного середовища.	Система експресії: плазмід рJDB(MSIL) та штам <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y-791. Клітини штаму несуть мутацію в гені PHO80. Конструкція вектора експресії, введеного в штам дріжджів, така, що клітини не секретують цільової білок.	Гістидин-HCl×H <sub>2</sub> O, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> -цитрат, MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O, NaCl, CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O, KCl, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , глюкоза, H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O, KI, FeCl <sub>3</sub> ×GH <sub>2</sub> O, MnSO <sub>4</sub> , NaMoO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O, ZnSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O, біотин, кальцію пантотенат, фолієва кислота, інозит, нікотинова кислота, П-амінобензойна кислота, піридоксину гідрохлорид, рибофлавін, тіаміну гідрохлорид	Температура 30°C, швидкість обертання мішалки 200об/хв, аерація 0,2-0,8л/хв на 100л культуральної рідини, 36-50 годин.	[59, 60]
<b>ІЛ-2</b> , ендогенно, абсорбція при 600нм (A600) становить 0,6-0,8.	Система експресії: плазмід рЕТ22b (+) штам <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3). Використовували фрагмент плазмиди Nde1/XHo1. Індукцію цільового білка отримували з використанням ізопропілогалактози (IPTG).	LB-бульйон або супер бульйон (SB) з додаванням ампіциліну	Температура 37°C при орбітальному качанні з швидкістю 200об/хв, 12 годин (протягом ночі)	[61]

Продовження таблиці 1.1

Продукт, його локалізація, вихід	Опис генетичної конструкції	Склад живильного середовища	Опис режиму культивування	Джерело
<b>ІЛ-3</b> , ендогенно, до 30% тотального клітинного білку.	Система експресії: плазмідна рЗРТЕІL3 та штам <i>Escherichia coli</i> ВКПМ В-6968. Реконбінантна плазмідна містить тандем промоторів Р8, РtaС і Рt7, два Lас-оператора, підсилювач трансляції гена 10 фага Т7, термінатор транскрипції фага fd, ген β-лактамази і штучний ген людського інтерлейкіну-3.	УТ-бульйону (рН 7,0) з ампіциліном, через 2 години після початку ферментації додають ізопропілтіо- $\beta$ -D-галактозид	Температура 37°C, швидкість обертання качалки 190об/хв, рівень рН 7,0, 8 годин.	[62]
<b>ІЛ-6</b> , ендогенно, абсорбція при 600 нм (А600) становить 0,6-0,8. Вихід інтерлейкіну 150мг/л.	Система експресії: плазмиду рЕТ30 трансформували в комплементарні клітини rossetta 2DE3 отримавши штам <i>Escherichia coli</i> rossetta 2DE3	LB-бульйон, хлорамфенікол і камініцин	Температура 37°C при орбітальному качанні з швидкістю 250об/хв, 18 годин	[63]

Продовження таблиці 1.1

Продукт, його локалізація, вихід	Опис генетичної конструкції	Склад живильного середовища	Опис режиму культивування	Джерело
<b>ІЛ-7</b> , ендогенно, 15-20% від вмісту сумарних білків клітини. Вихід цільового білка досягав 0,95мг/мл біомаси	Система експресії: плазмід рACYC184 (Thermo Scientific, №X06403) та штам <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) (GE Healthcare, 27-1542-01). Клітини цього штаму мають ген РНК-полімерази фага Т7, який інтегровано у бактеріальну хромосому в складі вектора λD69. Він може експресуватися під транскрипційним контролем промотора лактозного оперона після індукування ІПТГ або за протоколом аутоіндукції.	Пептон, дріжджовий екстракт, $MgSO_4 \times 7H_2O$ , $(NH_4)_2SO_4$ , $KH_2PO_4$ , $Na_2HPO_4$ , лактоза, гліцерол, глюкоза, D-мальтоза, $NaHCO_3$ та хлорамфенікол.	Температура 37,5°C при орбітальному качанні з швидкістю 200об/хв 17 годин.	[64]
<b>ІЛ-10</b> , ендогенно, вихід білка 0,2-2мг/мл.	Система експресії: плазмід рZYJ1 та штам <i>Pichia pastoris</i> GS115. Плазмід кодує α-фактор попередньо про-пептид на N-кінці і 6XHis-tag та C-кінці, на <i>Bam</i> HI та <i>Not</i> I	Дріжджовий екстракт, пептон, YNB без аміаку, гліцерин, біотин, фосфат калію	Температура 30°C при швидкості перемішування 200об/хв 12 годин (протягом ночі).	[65]

Продовження таблиці 1.1

Продукт, його локалізація, вихід	Опис генетичної конструкції	Склад живильного середовища	Опис режиму культивування	Джерело
<b>ІЛ-36РА</b> , ендогенно, 24г неочищеного ІЛ- 36 РА з реактора об'ємом 250л.	Система експресії: плазмиди рЕТ-IL36Raf і рBAD15A та штам <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3). Обробляли реструктазами NdeI і XhoI, потім лігували за допомогою лігази фага Т4 далі обробляли реструктазами EcoRI і BamHI, потім лігували за допомогою лагази фага Т4.	Розчину солей М9, гідролізат казеїну, дріжджовий екстракт, магній сірчаноокислий, кальцій хлористий, ампіцилін, хлорамфенікол, натрію гідрооксид або ортофосфорна кислота.	Температура 37°C, швидкість обертання мішалки 200об/хв, рівень рН 7,0, витрата повітря 4л/хв, 18 годин.	[66]
<b>ІНФ-α<sub>1</sub></b> , ендогенно, вихід білка складає 2,2·10 <sup>7</sup> клітин/г.	Система експресії: штам <i>Escherichia coli</i> K12 ВМН-71-17 та плазмиди р8212, рUR-222, рBV-114 ірКC-30, які мають промотер PL, A <sup>R</sup> і ген який кодує IFN-α <sub>1</sub> .	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, вітамін В <sub>1</sub> , мікроелементи, глюкоза, піногасник	Температура 37°C, швидкість обертання мішалки 300об/хв, рівень рН 7,0, рівень розчинення кисню 50%, 24 години.	[67]
<b>ІНТ-α<sub>2b</sub></b> , ендогенно, 10-20% від сумарних білків.	Система експресії: плазмиди рАУС-ЕТ-(hIFN-α <sub>2b</sub> )-lacI та штам <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3). Введення профагу λD69 <sup>imm21</sup> в область гену int та бактеріофагу Т7 під контролем промокоду p <sub>lacuv5</sub> <i>E. coli</i> .	L-бульйон або середовище М9 та стрептоміцин	Температура 30°C, рівень рН 6,8-7,0.	[68]



Продовження таблиці 1.1

Продукт, його локалізація, вихід	Опис генетичної конструкції	Склад живильного середовища	Опис режиму культивування	Джерело
<b>ІНТ-β</b> , ендогенно, до 60% синтезованого білку.	Система експресії: штам <i>Escherichia coli</i> SE1 та плазмиди pET-23a (+) і pStaby.	2L ТВ з гліцерином	Температура 37°C при швидкості обертання мішалки 200об/хв, 8 годин.	[69]
<b>ІНТ-γ</b> , ендогенно, 0,35-0,9г білку на 58г сухих клітин.	Система експресії: в штам <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) трансформували плазмиду pET3a індуковану вектором експресії, який містить ген hIFN-γ в сайти зв'язування <i>NotI</i> та <i>NedI</i> з використанням хлориду калію	Глюкоза, MgSO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , NaCl, NH <sub>4</sub> Cl.	Рівень pH 7,0±0,05, швидкість перемішування – змінна, насиченість культуральної рідини повітрям складала 20-30%, 23 години	[70]
<b>ТФР</b> , ендогенно, 1г білку з 1л культуральної рідини.	Система експресії: плазмиди та штам <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3). Штам експресує T7-РНК-полімерази під промотором lacUV5 після додавання ізопропіл-β-D-тілогалактоперидози.	Багате середовище ТВ, з додаванням ампіциліну	Температура 25°C, 20 годин.	[71]

Продовження таблиці 1.1

Продукт, його локалізація, вихід	Опис генетичної конструкції	Склад живильного середовища	Опис режиму культивування	Джерело
<b>Рекомбінантний ФНП <math>\alpha</math>-людини</b> ендогенно в цитоплазмі, 24% від сумарного клітинного білку.	Система експресії: плазмідна рTNF31 $\Delta$ та штам <i>Escherichia coli</i> SG20050. Ген ФНП-альфа під контролем промоторів ранньої області бактеріофага 17, які забезпечують конститутивний синтез цільового білка.	L-бульйон	Температура 37°C, до стаціонарної фази.	[72, 73]
<b>ФНП <math>\alpha</math>-злитий (sFV/TNF-<math>\alpha</math>),</b> ендогенно, кінцевий вихід очищеного білка складав 50мг/л.	Система експресії: злитий ген V <sub>K</sub> L V <sub>H</sub> -TNF- $\alpha$ , вставлений в сайт зв'язування <i>NdeI/Hind III</i> , трансформували в вектор експресії FLAGpF1, а потім трансформували в штам <i>Escherichia coli</i> K802	L- бульйон, ампіцилін, IPTG, гліцин, Тритон-X-100	Температура 30°C при орбітальному качанні з швидкістю 300об/хв, 10 годин.	[74]

Роботи різних авторів свідчать про можливість ефективного застосування рослинних екстрактів в якості стимуляторів росту бактеріальних клітин, а також синтезу бактеріями певних продуктів, в т.ч. і рекомбінантних білків [75-77]. У роботах було показано стимулюючу дію на ріст рекомбінантних бактерій *E. coli* і біосинтез ними рекомбінантного білка теплового шоку *Chlamydia trachomatis* HSP-60 екстрактів двох рослин сімейства амарилісових - клівії кіноварної *Clivia miniata* і зефірантесу великоквіткового *Zephyranthes grandiflora* (у вигляді добавки до живильного середовища в діапазоні 0,5-1,0%) [75-77]. У літературі описано можливість стимуляції росту шигел та стафілококів при додаванні до живильного середовища вітаміну K<sub>1</sub> [78].

#### **1.2.2.2 Характеристика гідродинамічних умов культивування для отримання рекомбінантних білків**

Аерація і перемішування для забезпечення культури продуцента киснем відіграють важливу роль у біосинтезі білків. Простий спосіб підвищення аерації в збільшенні швидкості перемішування шейкера (для качалкових колб) або перемішуючого пристрою (для біореактора). Експресія білка в більшості випадків здійснюється в діапазоні швидкості обертання від 150 до 220об/хв. При більш високих швидкостях перемішування відбувалися піноутворення, яке може зменшити доступ кисню до клітин [36].

Досліди по впливу режимів гідродинамічних процесів на продуктивність і життєздатність рекомбінантних бактерій проводилися вченими багатьох країн світу. Зробивши аналіз отриманих ними результатів, основні з яких наведено в таблиці 1.2, ми прийшли до висновку, що у випадку з рекомбінантними мікроорганізмами необхідно дотримуватися більш бережних режимів здійснення процесу, ніж при культивуванні звичайних штамів [79, 80, 81-90].

Вивчаючи впливи гідродинамічних умов та аерації на кінетику росту бактерій *Thermusthermo philus* HB27 визначили, що швидкість росту культури зростає із збільшенням інтенсивності перемішування та аерації. Але збільшення

швидкості перемішування має більш вагомий вплив ніж підвищення інтенсивності аерації. Збільшення частоти обертання перемішуючого пристрою від 200 до 300об/хв призвело до підвищення швидкості росту бактерій в два рази, а найвища продуктивність біосинтезу (накопичення біомаси і вихід продукту) спостерігалися при 500об/хв [82].

Таблиця 1.2 – Порівняння гідродинамічних умов при глибинному культивуванні рекомбінантних мікроорганізмів

Назва продуценту	Швидкість перемішування, об/хв	Швидкість, при якій накопичується максимальна кількість біомаси, об/хв	Швидкість, при якій накопичується максимальна кількість цільового продукту, об/хв	Джерело
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> SP 304	200-800	200	400	[81]
<i>Thermus thermophilus</i> HB 27	200-500	500	500	[82]
<i>Bacillus licheniformis</i> NCIM-2042	200-400	300	300	[83]
<i>Escherichia coli</i> LipR1	200-350	300	300	[84]
<i>Escherichia coli</i> BL 21	200-550	400	400	[85]
<i>Bacillus subtilis</i> DB 104	130-150	150	150	[86]
<i>Corynebacterium glutamicum</i> MCNB 10025	200-1200	410	-	[87]
<i>Escherichia coli</i> strain B	600-1700	-	-	[88]
<i>Escherichia coli</i> NCIB 10000	500-1500	-	-	[88]
<i>Bacillus cereus</i>	600-1700	-	-	[88]
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	600-1400	-	-	[88]
<i>Escherichia coli</i> SGK25/pIF TREN	50-400	200	400	[79, 89]
<i>Escherichia coli</i> B/pTG201	50-200	50	-	[80]
<i>Escherichia coli</i> TER1 BD18	150-200	150	-	[90]

При глибинному культивуванні рекомбінантних *B. licheniformis* NCIM-2042 досліди проводили для швидкості перемішування 200, 300 та 400об/хв, а також для трьох різних значень інтенсивності аерації. Максимальний вихід ферменту протеази спостерігався при швидкості перемішування 300об/хв. Відхилення від цієї величини, як в меншу (до 200об/хв), так і в більшу (до 400об/хв) сторону, негативно впливало на синтез ферменту та накопичення біомаси. Але, якщо збільшити інтенсивність аерації, то максимальний вихід протеази спостерігатиметься при 200об/хв [82].

Для визначення впливу гідродинамічних умов на синтез ферменту ліпази рекомбінантними *E. coli* LipR1 досліди проводили для швидкості перемішування в діапазоні від 200 до 350об/хв. Максимальний рівень накопичення біомаси і синтезу ферменту спостерігався при 300об/хв. Більш низькі швидкості перемішування негативно впливали на процес розвитку бактерій та біосинтезу ліпази. Якщо швидкість перемішування збільшити до 350об/хв відбувається зниження росту культури та синтезу ферменту [83].

Підчас дослідження впливу гідродинамічних параметрів на синтез амінокислоти L-фенілаланін іншим рекомбінантним штамом *E. coli* BL21, максимальний вихід продукту спостерігали при 400об/хв. Збільшення кількості накопиченої біомаси і синтезованої амінокислоти спостерігатиметься при швидкості перемішування що знаходиться в діапазоні від 200 до 400об/хв. Подальше збільшення частоти обертання мішалки до 500об/хв призведе до зниження показників виходу цільового продукту [85].

Вплив гідродинамічних умов на стабільність плазмід при культивуванні рекомбінантного штаму *E. coli* B/pTG201 іммобілізованого шляхом утворення гелевих кульок з карагінану, досліджували на двох типах поживного середовища LB і M9 та в діапазоні швидкостей перемішування від 50 до 200об/хв. Збільшення частоти обертання перемішуючого пристрою, для обох поживних середовищ, призвело до зменшення кількості клітин в гелевих кульках (для середовища LB кількість накопиченої біомаси зменшилася від 3,68клітин/мл при 50об/хв до 1,61клітин/мл при 200об/хв, та для середовища M9 від 2,06клітин/мл при 50об/хв

до 1,39клітин/мл при 200об/хв), що було викликано сильними напруженнями зсуву в них [80].

Вивчення комплексного впливу рН і швидкості перемішування на рекомбінантний штам *E. coli* TERIBD18 показало, що при рН 7,5 і частоті обертання мішалки 200об/хв накопичується менша кількість біомаси, ніж при рН 6,5 та 150об/хв. У першому випадку кількість накопиченої біомаси складала 1,35г/л/год, у другому 1,73г/л/год [90].

Дослідження впливу частоти обертання перемішуючого пристрою на синтез ферменту ендоксилази рекомбінантним штамом *B. subtilis* DB104 глибинним способом [86] проводили для 130 і 150об/хв. Отже, синтез ферменту при швидкості перемішування 150об/хв був у два рази більшим ніж при 130об/хв.

Досліди по впливу гідродинамічних умов на синтез біотину в процесі глибинного культивування рекомбінантних *Sphingomonas paucimobilis* SP304 проводили при частоті обертання перемішуючого пристрою в межах від 200об/хв до 800об/хв, з використанням різних конструкцій мішалок. При 200 та 800об/хв не спостерігалось ніяких ознак росту клітин та синтезу вітаміну. Найвища концентрація біомаси утворювалася при 600об/хв, а от максимальний вихід біотину спостерігався при 400об/хв [81]. Це може бути пов'язано з напруженнями зсуву, які виникали в клітинах мікроорганізмів.

Аналогічні результати отримали і при використанні різних типів мішалок. Максимальний приріст біомаси спостерігався при 600об/хв не залежно від типу робочого колеса. А от синтез біотину при використанні якірної мішалки був максимальним при 200об/хв, а для турбінної мішалки та мішалки конструкції Maxblend® (конструкція якої представлена на рис. 1.2) - при 400об/хв [81].

Авторами [81] було встановлено, що зовнішня будова клітин залежить від умов культивування. Провівши мікроскопічний аналіз культуральної рідини після 120 годин культивування отримали, що при 200об/хв розміри клітин були більшими ніж в решті випадків. Клітини бактерій мали овальну форму при низьких обертах мішалки (200-600об/хв) та видовжену форму при високих (800об/хв) у випадку, використання турбінної мішалки. Видовження клітин, також

спостерігалось при використанні пропелерної мішалки при 400об/хв і більше. В обох випадках, коли клітини мали видовжену форму, знижувався рівень біотину, який синтезувався клітинами рекомбінантних бактерій [81].

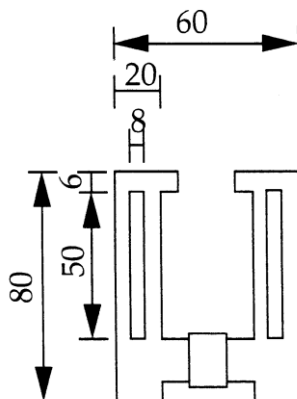


Рисунок 1.2 – Схематичне зображення мішалки конструкції Maxblend® [81]

При глибинному культивуванні рекомбінантного штаму *Corynebacterium glutamicum* MCNB 10025 при нормальних (410об/хв) та при стресових (1200об/хв) умовах визначили, що інтенсивна швидкість обертання перемішуючого пристрою приводить до зменшення розмірів клітин мікроорганізмів та утворення останніх неправильної форми [87]. При мікроскопічному аналізі також було виявлено, що клітинна стінка бактерій збільшила товщину. Скоріше за все, це пов'язано із впливом інтенсивних зовнішніх механічних навантажень. За гіпотезою авторів [87] клітини у такий спосіб намагаються захистити свою внутрішню структуру від зовнішнього впливу та пошкоджень.

В роботі [88] вивчали вплив гідродинамічних умов на розміри та форму клітин мікроорганізмів. Досліджувалися два рекомбінантні штами кишкової палички *E. coli* strain B і *E. coli* NCIB 10000 та по одному штаму *B. cereus* і *Staphylococcus epidermidis*. У всіх випадках спостерігалася лінійна залежність між об'ємом клітин і швидкістю її росту та інтенсивністю перемішування, яка змінювалася від 500 до 1500об/хв – зі збільшенням кількості обертів мішалки об'єм клітин збільшувався для кожного із досліджуваних мікроорганізмів. Якщо ж порівняти кінцевий вихід біомаси при різних швидкостях перемішування, то

можна виявити, що збільшення розмірів пов'язане із збільшенням кількості води в клітинах. Авторами [88] було зроблено припущення, що збільшення розмірів клітин при збільшенні швидкості обертання мішалки пов'язано із напруженнями зсуву, що виникають в процесі перемішування, та не було встановлено їх негативний вплив на життєздатність клітин.

### **1.2.3 Методи виділення та очистки рекомбінантних цитокінів**

Після успішної експресії рекомбінантного білка необхідно здійснити його виділення та очистку з метою отримання високоочищеного продукту терапевтичної дії. Подальша обробка рекомбінантних білків відіграє важливу роль і складає близько 50–80% вартості загального виробництва. У більшості випадків, цільовий білок накопичується в цитоплазмі у нерозчинній формі в вигляді тілець-включень [36].

Для відділення біомаси від культуральної рідини використовують центрифугування та фільтрацію. Для розділення культуральної рідини, отриманої в колбах на качалках або лабораторних ферментерах, використовують періодичні центрифуги; у великомасштабному виробництві (пілотні або виробничі ферментери) – безперервні центрифуги. Для відділення клітинної біомаси використовуються різні методи фільтрації: це поверхнева фільтрація, глибинна фільтрація, фільтрація центрифугуванням, фільтрація в поперечному потоці і фільтрація на барабанному фільтрі [36].

Після отримання біомаси клітин для виділення тілець включень, в яких знаходиться синтезований рекомбінантний білок, необхідно зруйнувати клітинну стінку продуцента (дезінтеграція). Для цього використовують різні методи, основними з яких являються хімічні, біологічні та фізичні [36].

Хімічні методи дезінтеграції включають обробку лугом, органічними розчинниками, детергентами. Якщо білковий продукт не руйнується при рН від 10,5 до 12,5, то можна досить ефективно лізувати великі кількості бактеріальних клітин. Під дією детергентів у мембранах бактеріальних клітин утворюються



пори, через які білки та інші молекули виходять з клітин. На жаль, застосування детергентів погіршує техніко-економічні характеристики технологій, у більшості випадків у їх присутності білки денатурують, а крім того, вони можуть забруднювати кінцевий продукт [36].

Біологічні методи включають ферментативний лізис лізоцимом та етилендіамінтетраоцтовою кислотою (EDTA), які здатні руйнувати клітинні стінки грамнегативних бактерій. Ферментативна обробка високоспецифічна, а лізис проходить в м'яких умовах [36].

Фізичні включають немеханічні (осмотичний шок, швидке багатократне заморожування/розморожування) та механічні (обробка ультразвуком, руйнування за допомогою кульових млинів, гомогенізація під тиском) методи. Метод багатократного заморожування/розморожування є довготривалим по часу і недостатньо ефективним, так як багато клітин залишаються незруйнованими. Використання ультразвуку досить ефективне в плані руйнування клітин, але під час обробки клітинної маси може відбуватися її нагрівання та денатурація білка, а організувати процедуру охолодження клітинної суспензії під час обробки ультразвуком в великих об'ємах досить проблематично, тому використання даних методів для промислового виробництва є недоцільним [64]. У великомасштабних процесах для руйнування клітин зазвичай використовуються гомогенізатори високого тиску і кулькові млини [36].

Після руйнування клітин, розчинну білкову фракцію видаляють за допомогою центрифугування. Осаджені тільця-включення промивають буфером, який містить хаотропні реагенти в низьких концентраціях або детергенти. Цей етап необхідний для видалення небілкових домішок, а також білків, які, адсорбуючись на тільцях включення завдяки гідрофобним взаємодіям, можуть надалі впливати на проходження рефолдингу та кінцевий вихід цільового білка [49].

Багато комерційних рекомбінантних білків (наприклад інсулін, інтерферони, інтерлейкіни) продукуються у формі тілець-включень, де рекомбінантні білки знаходяться в агрегованій, неактивній формі. Для

відновлення біологічної активності білка, тільки-включення повинні бути сольобілізовані і рефолдовані. Тому наступним етапом технології є процедура розчинення тілець включень [36, 64].

Розчинення тілець-включень, як правило, здійснюється шляхом використання високонцентрованих хаотропних агентів (наприклад, 8М сечовина, 6М гуанідин гідрохлорид або тіоціонатні солі) та/або детергентів (0,3-1% додецилсульфат натрію, 1% бромід цетилтриетиламонію, 2% N-лаурилсаркозин, твін-80). За необхідності в сольобілізуючий буфер додають відновлювальні агенти (до 50 мМ  $\beta$ -меркаптоетанол, 1мМ дитіотриетол (ДТТ) або цистеїн). Для видалення іонів металів, які призводять до небажаного окислення тіольних груп білків, до складу сольобілізуючого буфера можуть бути додані хелатуючі реагенти, такі як EDTA, в концентрації від 1 до 10мМ. Крім цього, для розчинення тілець включень використовують лужні або кислі буферні розчини з крайніми значеннями рН в комбінації з вище переліченими умовами. Робочу температуру під час сольобілізації білка підбирають в залежності від складу буфера і сольобілізуючого агента. Найчастіше розчинення проводять при температурі 30°C [91].

Задля відновлення біологічної активності необхідно видалити з сольобілізованого білка денатуруючі агенти, тобто здійснити його рефолдинг, використовуючи наступні методи: розведення; діаліз; діафільтрація за допомогою ультрафільтраційної мембрани; хроматографія (афінна, іонообмінна, ексклюзійна) [66].

Початкове хроматографічне очищення рекомбінантних білків зазвичай проводиться перед рефолдингом (в умовах денатурації) або після етапу рефолдингу. Етап рефолдингу з хроматографічним очищенням є найкращим вибором, оскільки деякі високомолекулярні агрегати, а також контамінанти можуть бути спільно очищені за один етап [36].

Під час рефолдингу шляхом розведення ренатуруючий буфер зазвичай вносять прямо в розчин сольобілізованого білка [91]. Розведення успішно використовується для рефолдингу таких рекомбінантних цитокінів, як

інтерферон- $\gamma$  та гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор. Рефолдинг білків з незначною агрегацією також досягається з використанням добавок в буферах для рефолдингу: гліцерин, манітол, L-аргінін/HCl, низькі концентрації сечовини (1-2М) або гідрохлорид гуанідину тощо. Дослідники повідомили про позитивний вплив гліцерину та L-аргініну/HCl на зниження агрегації людського інтерферону- $\gamma$ , рекомбінантного людського BMP2 (bone morphogenetic protein 2) і фактору росту фібробластів [36]. Істотним недоліком даного підходу є необхідність подальшої ультрафільтрації для концентрування білка з сильно розведених розчинів, а також високий вміст продуктів неправильного рефолдингу, тому в промисловості цей метод не використовують [91].

Рефолдинг білка можна також здійснити шляхом діалізу (одно- або багатостадійного) та діафільтрацію з використанням ультрафільтраційних мембран [36]. Методики з використанням діалізу засновані на відносно повільному видаленні солубілізуючого реагенту через мембрану з фіксованим розміром пор. Так як, рівновага в системі встановлюється впродовж тривалого часу, цей процес рідко використовують в промислових масштабах. Крім того, при досягненні проміжних концентрацій денатуруючих агентів можлива агрегація білка. Для промислових цілей більш застосований метод діафільтрації. При даному підході видалення денатуруючого агента не лімітується швидкістю дифузійного процесу, але значні рівні накопичення денатурованого білка на мембрані обмежують широке використання цього методу [36, 64, 91].

В промислових масштабах зазвичай використовують хроматографічні методи, такі як металхелатуюча, іонообмінна, оберненофазова хроматографія, а також гель-фільтрація. Перевага хроматографічних методів полягає в можливості проведення процесу в умовах, при яких білок знаходиться в денатурованому стані [64]. З використанням відповідних буферних розчинів (без денатуруючого агента) та оптимізацією умов елюції, можна одразу отримати чистий і біологічно активний рекомбінантний білок. Є дані про одночасний рефолдинг і очищення з використанням афінної хроматографії для інтерферону, фактору росту фібробластів та інтерлейкіну [36].

Гель-фільтрація є швидким і ефективним методом, що широко використовується в промисловості. Зазвичай для рефолдингу методом гель-фільтрації застосовують буферні розчини з вмістом амінокислот (гліцин, аргінін), детергентів в низьких концентраціях (0,1–0,5% неіонний поліоксиетилен-40; 0,001–0,005% твін-80), а також певні аніони (фосфати, сульфати). Ці реагенти фактично не впливають на швидкість рефолдингу, але значно зменшують ймовірність утворення агрегатів, беручи участь в дестабілізації міжмолекулярних і гідрофобних взаємодій [36].

На наступному етапі до отриманого білкового розчину необхідно додати окислювально-відновну пару низькомолекулярних тіолів для формування дисульфідних зв'язків, тобто для проведення процедури ренатурації (наприклад: відновлений/окислений гутатіоні, дитіотриетол/окислений глутатіон, дитіоеритритол/окислений глутатіон або цистеїн/цистин). Рекомендована концентрація відновленого тіолу для формування дисульфідних зв'язків складає від 1 до 10мМ, співвідношення відновленої і окисленої форм від 10:1 до 3:1 [64].

Очистка рекомбінантних цитокінів є важливим етапом для досягнення бажаного рівня чистоти отриманих білків, який визначається остаточною сферою застосування продукту. Для отримання рекомбінантних терапевтичних білків використовують різні хроматографічні методи, такі як афінна, іонообмінна, гідрофобна та ексклюзійна хроматографія [36].

## **Висновки до розділу 1**

ІЛ-7 являється центральним цитокіном імунної системи людини та відіграє важливу роль у формуванні її імунітету. У зв'язку з цим, ІЛ-7 можна використовувати для лікування різноманітних імунодефіцитних станів людини, ранових інфекцій, онкологічних захворювань тощо. Одним із основних напрямів отримання ІЛ-7, як й інших цитокінів, на сьогоднішній день, являється біотехнологічний з використанням технології рекомбінантних ДНК.

Проаналізувавши літературні дані, було виявлено що, рекомбінантні мікроорганізми потребують більш лагідних умов культивування. Лімітуючими чинниками процесу, при цьому, являються гідродинамічні параметри (швидкість обертання перемішуючого пристрою, рівень аерації), температура, рН, склад живильного середовища та інші. Таким чином, регулюючи зазначені фактори, можна впливати на підвищення кількості цільового продукту, який отримують в кінцевому результаті.

Особливу увагу, в даному випадку, варто приділити саме якісному та кількісному складу живильного середовища, оскільки кількість синтезованого метаболіту напряду залежить від того, наскільки середовище багате органічними та мінеральними компонентами, та в якій мірі вони збалансовані між собою. Також, виявлено що певні речовини, такі як вітаміни, різноманітні екстракти, амінокислоти, антибіотики тощо, в певних кількостях, можуть мати стимулюючу дію на синтез метаболітів та приріст біомаси.

Проте, кожен випадок являється індивідуальним і потребує додаткового ретельного вивчення, тому для підвищення кількості синтезованого ІЛ-7 рекомбінантним продуцентом варто дослідити вплив кількості органічних та мінеральних компонентів поживного середовища на його кінцевий вихід. Також, можна вивчити дію різноманітних стимулюючих добавок на вихід ІЛ-7, таких як фітоекстракти та вітаміни, оскільки з аналізу літератури було встановлено, що саме вони є найбільш ефективними.

Ще одним показником, який суттєво впливає на кількість кінцевого продукту, являється величина втрат та його чистота продукту на виході підчас виділення та очистки. Дана стадія є найбільш енерго- та трудозатратною і суттєво впливає не лише на кількість кінцевого продукту, а й на його собівартість. Варто зазначити, що неправильно підібрана технологія очистки може призвести до непридатності кінцевого продукту для його подальшого застосування. А у випадку з отриманням рекомбінантних білків медичного призначення, до етапу виділення та очистки цільового продукту приділяється підвищена увага, так як

необхідно забезпечити високу якість останнього. Тому, удосконалення даної стадії являється однією з перспективних задач подальших досліджень.

### **Результати, отримані у даному розділі, опубліковані у таких працях:**

1. **Motronenko VV**, Lutsenko TN, Ruzhynska LI, Gorshunov YuV, Galkin AYU. Comparative analysis of the effects of hydrodynamic conditions in submerged culturing of recombinant bacteria. Труды БГТУ, Серия 2: Химические технологии, биотехнология, геоэкология. 2017;2199:241-246.
2. Нечаєва ЯО, Грабчук СМ, Горшунов ЮВ, **Мотроненко ВВ**, Галкін ОЮ. Рекомбінантні білки терапевтичного призначення: особливості отримання, вивчення безпечності та ефективності (літературний огляд). Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки. 2017;2:85-93.
3. Сербов ВО, **Мотроненко ВВ**. Аналіз впливу механічних чинників при глибинному культивуванні мікроорганізмів. Innovative Biosystems and Bioengineering. 2019;3(1):45-51.
4. Наточій ТО, **Мотроненко ВВ**. Порівняльна характеристика біотехнологічних підходів до отримання рекомбінантних цитокінів людини у бактеріальних системах експресії. Innovative Biosystems and Bioengineering. 2019;3(3):128-145.
5. **Мотроненко ВВ**, Сербов ВО. Вплив перемішування при глибинному культивуванні мікроорганізмів. Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології: збірник наукових праць, випуск 3; 2017 жовт. 13; Харків. Х.: Вид-во НФаУ, 2017, с. 195-199.
6. **Мотроненко ВВ**. Вплив перемішування на рекомбінантні бактерії при глибинному культивуванні. XIII Międzynarodowej naukowi – praktycznej konferencji, «Wykształcenie i nauka bez granic – 2017»; 2017 grud. 07-15; Przemys. Przemys, 2017, с. 70-72.

## 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Матеріали

#### 2.1.1. Біологічні об'єкти

Біосинтез рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини молекулярної масою 17,4 кДа (rIL-7) проводили в бактеріальній системі *E. coli*. Система експресії була сконструйована за допомогою плазмиди pACYC184 (Thermo Scientific, №X06403) та штам *Escherichia coli* BL21 (DE3) (GE Healthcare, 27-1542-01) в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України. Клітини цього штаму мають ген РНК-полімерази фага Т7, який інтегровано у бактеріальну хромосому в складі вектора λD69. Він може експресуватися під транскрипційним контролем промотора лактозного оперону [92].

Для визначення біологічної активності фітоекстрактів, у роботі використовувалися бактеріофаги. Ми обрали шість бактеріофагів, які мають різні молекулярні мішені на поверхні *E. coli*, а саме: Т7 (абсорбується на ліпополісахаридах), λ (абсорбується на білку LamB), Ох2 (абсорбується на білку OmpA), Ох2h12 (абсорбується на білках OmpA і OmpC), Tulb (абсорбується на білку OmpC) і Т2 (абсорбується на білку OmpF).

Для моделювання ранової інфекції при дослідженні біологічної активності рІЛ-7, в якості збудника використовували штам *Pseudomonas aeruginosa*, який охарактеризований та зберігається у музеї патогенних для людини мікроорганізмів ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України». Мікроорганізм рухливий, має пігменти піоціанін, флюоресцеїн, синтезує триметиламін, оксидазо- та каталазопозитивний, дає гемоліз на кров'яному агарі, росте при +42°C, не росте при +50°C, відновлює нітрати до нітритів, має позитивну аргініндегідролазу, негативні лізин та орнітин декарбоксилази; утворює кислоту з глюкози. На середовищах Ендо, м'ясо-пептонному агарі (МПА) колонії цього штаму

*P. aeruginosa* складчасті, нагадують «квітки маргаритки». Відрізняється резистентністю до наступних антибіотиків: ципрофлоксацину, цефтазидіму, амікацину, цефепіму, меропенему. Чутливий до колістину. Штам резистентний до дії багатьох дезінфектантів: септаміну, санідезу, максисану, дисмозону, саніфекту, солізму, ентактиву, дезекону.

У дослідженнях по виявленню біологічної активності рІЛ-7 при моделюванні та лікуванні ранових інфекцій, використовували білих неінбредних (безпородних) мишей самців вагою 14-18 г, віком 3 тижні.

### 2.1.2 Реактиви та середовища

При проведенні досліджень використовували наступні хімічні реактиви та готові поживні середовища:

- пептон (Becton, Dickinson and Co. Sparks, Франція);
- дріжджовий екстракт (Helicon, Росія);
- лактоза (Sigma, США);
- гліцерол (Sigma, США);
- глюкоза (AppliChem, Німеччина);
- D-мальтоза (Макрохим, Росія);
- сульфат магнію  $MgSO_4 \times 7H_2O$  (AppliChem, Німеччина);
- сульфат амонію  $(NH_4)_2SO_4$  (Sigma, США);
- дигідрофосфат калію  $KH_2PO_4$  (ROTH, Німеччина);
- гідрофосфат натрію  $Na_2HPO_4$  (AppliChem, Німеччина);
- гідрокарбонат натрію  $NaHCO_3$  (Макрохим, Росія);
- хлорамфенікол (USB, США);
- коріння і листя клівії кіноварної *Clivia miniata*;
- цибулини зефірантесу великоквіткового *Zephyranthes grandiflora*;
- 40%-ий етилоий спирт;
- вода дистильована;
- соєвий хвосфатидилхолін;



- вітамін K<sub>1</sub>;
- 15%-ий поліакриламідний гель;
- LB Agar (GE Healthcare, США);
- м'ясо-пептонний агар (МПА);
- ізотонічний розчин хлориду натрію NaCl;
- моноклональні антитіла до ІЛ-7 людини 314B5;
- моноклональні антитіла до ІЛ-7 людини 325D2;
- сефароза 6В;
- тетраетоксисилан (ТЕОС);
- цитратно-фосфатний розчин (рН 2,4);
- сечовина;
- хлорид магнію.

### 2.1.3 Лабораторне обладнання

Підчас проведення експериментальної частини роботи використовували наступне основне обладнання:

- ламінарний бокс Hera Safe;
- набір для стерилізації культуральних середовищ;
- спектрофотометр;
- холодильники на 4°C, мінус 20°C і мінус 70°C,
- рідинний хроматограф низького тиску Biologic LP з колектором фракцій;
- термостат ТС-80М;
- камера для вертикального електрофорезу «BioRad»;
- центрифуга 5804 з набором роторів;
- дозатори одно- та восьмиканальні різного об'єму
- шейкер лабораторний;
- лабораторний млинок ЛЗМ-1;
- вакуумний ротаційний випарник.

## 2.2 Методи дослідження

### 2.2.1 Оптимізація кількісного складу живильного середовища

У випадку залежності кінцевого результату від багатьох факторів, використовується дробовий факторний експеримент (ДФЕ), який представляє собою частку (дробові репліки: 1/2, 1/4, 1/8, тощо) від повного факторного експерименту [93].

Суть методу полягає в тому, що теоретично планують кількість дослідів та підбирають експериментальні комбінації між співвідношенням різних фактору, варіюючи значення кожного з них в межах певного діапазону (в залежності від кількості досліджуваних факторів), які впливають на кінцевий результат. Потім проводять експериментальну частину, відповідно до отриманої матриці планування, та визначають експериментальне значення кінцевих показників. На основі отриманих даних розраховують коефіцієнти регресії та теоретичне значення контрольних параметрів процесу. І в самому кінці порівнюють результати отримані дослідним та експериментальним шляхом, різниця між ними не повинна перевищувати 5% [93].

Результати дослідів представляли у лінійному вигляді і описували рівнянням регресії:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n, \quad (1)$$

де  $n$  – кількість дослідів.

Розрахунок коефіцієнтів здійснювали за формулою:

$$b_i = \frac{1}{N} \cdot \sum_{u=1}^N x_{iu} \cdot \bar{y}_u, \quad i = 1, 2, \dots, n, \quad (2)$$

де  $\bar{y}_u$  – середнє значення за паралельними дослідями  $i$ -го рядка матриці планування, що обчислювали за формулою:

$$\bar{y}_u = \frac{1}{m} \cdot \sum_{k=1}^m y_{uk}, \quad (3)$$

де  $m$  – кількість паралельних дослідів.

Властивості такої матриці планування дозволяють розрахувати коефіцієнти регресії, незалежно один від одного за результатами всіх досліджень [93].

При приготуванні живильного середовища частину компонентів додавали в твердому стані, а частину у вигляді розчинів і подальші дослідження проводили використовуючи їх. Так, лактозу, гліцерол і глюкозу, додавали у вигляді розчину 5052, який містить 10% лактози, 25% гліцеролу та 2,5% глюкози; D-мальтозу – у вигляді 10%-го розчину, сульфат амонію  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , – 0,5М розчину; дигідрофосфат калію  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1М розчину; гідрофосфат натрію  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 1М розчину.

Оптимізацію кількісного складу проводили в два етапи: спочатку оптимізували базове середовище [92] по вмісту органічних компонентів, а потім отримане середовище оптимізували по кількісному складу мінеральних речовин.

### 2.2.2 Приготування і оцінка рослинних екстрактів

Готували рослинні екстракти таких рослин: кореневища, коріння і листя клівії кіноварної *Clivia miniata*, цибулини зефірантесу великоквіткового *Zephyranthes grandiflora*. Рослинну сировину подрібнювали до частинок розміром 3-5 мм за допомогою лабораторного млинка ЛЗМ-1. Екстракт готували при співвідношенні фітосировина:екстрагент (спирт етиловий 40%) дорівнює 1:5. Екстракцію здійснювали при кімнатній температурі за допомогою методу дробової двоетапної мацерації, при цьому тривалість кожного циклу екстракції становила 12 годин. Отримані екстракти упарювали за допомогою вакуумного ротаційного випарника при температурі 40°C до сухого залишку і розчиняли дистильованою водою до початкового об'єму. Визначення білка в отриманих екстрактах проводили фотоколориметрично-біуретовим методом [94]. Кількісний вміст полісахаридів в екстрактах проводили за допомогою гравіметричного методу [95], вміст флавоноїдів (у перерахунку на рутин) - спектрофотометричним методом [96], а вміст алкалоїдів (в перерахунку на лікорин) - фотометричним методом [97].

### 2.2.3 Отримання ліпосомальних форм фітоекстрактів та вітаміну K<sub>1</sub>

Приготування ліпосом проводили гідратацією ліпідної плівки з подальшою екструзією за методикою [98]. Органічний розчин ( $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}=2:1$ ), що містить соєвий фосфатидилхолін (СФХ), сушили в скляній колбі з круглим дном за допомогою роторного випарника в атмосфері азоту протягом приблизно 20хв при 110об/хв і при температурі 30°C. Вітамін K<sub>1</sub> і рослинні екстракти додавали в органічний розчин в концентраціях 125мкг і 1мг, відповідно. Отримані ліпідні плівки потім регідратували в присутності скляних кульок з фосфатно-буферним розчином (ФБР) з рН 7,4. Отриману суспензію п'ять разів пропускали через полікарбонатні мембрани зі зниженою порозністю (0,4, 0,2 і 0,1мкм) з використанням термобочкового екструдера. На закінчення, ліпосоми очищали за допомогою молекулярно-ексклюзійної хроматографії з сефадексом G-50 (Sigma, США) для видалення некапсульованого вітаміну K<sub>1</sub> та екстрактів.

### 2.2.4 Оцінка чистоти та біологічної активності рІЛ-7 *in vitro*

Рекомбінантний інтерлейкін-7 людини (рІЛ-7) був очищений із тілець-включення при використанні гель-фільтрації на сефедексі G-25 та іонообмінної хроматографії на сефарозах Q і SP. Контроль чистоти препарату проводили за допомогою електрофорезу у ПААГ з ДСН, а біологічну активність *in vivo* оцінювали на мононуклеарних клітинах периферичної крові (МНПК) здорових донорів (оцінку проліферації клітин проводили з використанням 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразол броміду – МТТ-тест) [69, 92]. У роботі використовували зразки препарату рІЛ-7 з концентраціями 20 та 30мкг/мл.

Електрофоретичний аналіз біомаси і білків проводили в 15% поліакриламідному гелі в присутності 1% додецилсульфату натрію в трис-тріціновій буферній системі [99]. Сканування забарвлених поліакриламідних гелів і розрахунок вмісту цільового білка визначали за допомогою програмного забезпечення TotalLab 1.10.

## 2.2.5 Оцінка впливу фітоекстрактів на *E. coli*

Ефективність посіву бактеріофагів в присутності екстрактів (дослід) в порівнянні з контролем (посіви без екстрактів) визначали підрахунком негативних колоній на чашках Петрі. У дослідному варіанті екстракти в обсязі 0,1мл вносили в 5,0мл розплавленого верхнього шару, додавали 0,1мл фага і 0,1мл рідкої культури *E. coli*, перемішували і виливали на чашку з нижнім шаром 1,8%-им агаризованим LB-середовищем. У контрольному варіанті посіви робили таким же чином, але замість екстракту вносили 0,1мл фізіологічного розчину NaCl. Результати посівів отримували на наступний день.

Результати дослідів обробляли статистично на основі загальноприйнятих методів з використанням деяких принципів дисперсійного аналізу [100]. Статистичну значимість відмінностей між групами даних оцінювали за допомогою t-критерію Ст'юдента і F-тесту, використовуючи для критерію Фішера вираз:

$$F_d = \frac{(M_1 - M_2)^2 (n_1 + n_2 - 2)}{C_1 + C_2} \cdot \frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}, \quad (4)$$

де  $F_d$  – критерій достовірності різниці по Фішеру;

$M_1$  і  $M_2$  – середнє значення для двох вибірок;

$n_1$  і  $n_2$  – об'єм першої в другій вибірки;

$C_1$  і  $C_2$  – випадкова (внутрішньогрупова) дисперсія в однофакторному дисперсному комплексі, сума квадратів центральних відхилень дат ( $V$ ) від своєї часткової середньої:

$$M_1 C_2 = \sum (V - M_i)^2. \quad (5)$$

Розраховане значення критерію Фішера  $F_d$  порівнювали зі стандартним значенням  $F_{st}$ , яке знаходили за допомогою спеціальних таблиць для двох степеней свободи, перша з яких завжди рівна одиниці ( $V_1 = 1$ ), а друга – сума об'ємів двох вибірок мінус два:

$$(V_2 = n_1 + n_2 - 2). \quad (6)$$

### 2.2.6 Дослідження біологічної активності рІЛ-7 *in vivo*

До експерименту залучено 20 мишей. Шерсть на загривку тварин вистригли, нанесли рану розміром 1-1,5см лезом безпечної бритви. Культуру *P. aeruginosa* вирощували протягом 24 годин на м'ясо-пептонному агарі в термостаті при температурі  $+37\pm 1^{\circ}\text{C}$ . З 24-годинної культури зробили бактеріальний інокулят, каламутність якого відповідала 10 одиницям за стандартним зразком каламутності (ОСЗ 42-28-85-01 П), що відповідає концентрації бактеріальних клітин  $0,08 \times 10^9$  клітин/мл. Кожній миші було внесено в рану по 0,1мл бактеріальної суспензії. Через дві доби з рани відбирали проби на посів збудника.

На 2 добу було сформовано дві експериментальних групи тварин: дослідну та контрольну, по 10 мишей в кожній. Кожна тварина знаходилася в окремій клітці. Кожній дослідній миші починаючи з 3-ї доби від початку експерименту та кожної доби до загоєння рани (елімінації збудника) протягом 7 діб внутрішньочеревно вводили 5мкг (0,1мл) препарату рІЛ-7. Таким чином, кожна тварина в дослідній групі одержувала 35мкг рІЛ-7. В контрольній групі тварин препарат рІЛ-7 не вводили.

Впродовж всього експерименту проводиться моніторинг проявів ранової інфекції та розмірів рани методом візуального спостереження та підтвердження ходу дослідження фотодокументуванням. Також контролювали елімінацію збудника в рані мікробіологічним методом, для виявлення динаміки зменшення його кількості.

### 2.2.7 Визначення елімінації *P. aeruginosa*

З метою виділення збудника інфекції та з'ясування його кількості, у всіх дослідних тварин щодня брали посіви – відокремлюване з ран. Для отримання кількісних результатів використовували метод серійних розведень. Готували первинне розведення 1:10. Для цього матеріал (відокремлюване з рани) вносили в

пробірки з стерильним ізотонічним розчином хлориду натрію. Далі з розведення (1:10) переносили по 0,1мл інокуляту в пробірку з 9,9мл стерильного ізотонічного розчину хлориду натрію. Так готували розведення до  $10^{-7}$ . З кожного розведення було зроблено висів на чашки з МПА в кількості 0,1мл з подальшим рівномірним втиранням в поверхню середовища за допомогою шпателя для отримання росту ізольованих колоній. Чашки інкубували при температурі  $+37\pm 1^\circ\text{C}$  протягом 24 годин. Наступної доби при наявності росту з певних розведень кількість вирослих колоній на агарі підраховували. Кількість мікроорганізмів в  $1\text{cm}^2$  (N) визначали за формулою:

$$N = n \cdot a \cdot b, \quad (7)$$

де n – кількість колоній, що виросли на чашці;

a – коефіцієнт посівної дози (при посіві 0,1мл дорівнює 10);

b – ступінь розведення матеріалу.

### 2.2.8 Синтез імуноафінного сорбенту

Синтез імуноафінного сорбенту на основі кремнійорганічних сполук проводили за базовою методикою [101, 102]. Для отримання золь-гелю сорбенту змішували 0,23мл алкілсилану, 0,23мл 0,0025М соляної кислоти (каталізатор), 0,04мл 10%-го поліетиленгліколю (ПЕГ-400) при мольному співвідношенні  $\text{H}_2\text{O}:\text{Si}=8:1$ . Отриману суміш струшували протягом 1 хв для отримання прозорої однорідної маси. Потім приготований розчин витримували на ультразвуковій ванні 30хв при температурі  $20-25^\circ\text{C}$ . Синтезований прегідролізат використовували як матрицю для введення антитіл на наступному етапі отримання імуноафінної колони (ІАК). Антитіла розводили у 0,02М натрій-фосфатному буфері (ФСБ), рН 7,2-7,4, до співвідношення 1:100. Потім 0,5мл антитіл додавали до прегідролізату. Все ретельно перемішували 5 хв і залишали до повного гелеутворення на 10 хв при кімнатній температурі. Отриманий гель промивали 2мл ФСБ. Найкращі характеристики золь-гель матеріалу проявлялися на другий день дозрівання. Потім гель (0,27г у перерахунку на сухий гель)

роздрібнювали і поміщали в стандартну колонку для твердофазної екстракції між двома пористими фільтрами. Отриману ІАК промивали 50мл ФСБ. Гель з іммобілізованими моноклональними антитілами (мАт) зберігали під шаром ФСБ при температурі 4°C [129].

### 2.2.9 Обробка експериментальних даних

Порівняння та аналіз експериментальних даних здійснювали використовуючи графоаналітичні методи – результати дослідів представляли у вигляді графіків, що давало можливість порівнювати ефективність досліджуваних параметрів на кінцевий результат.

При обробці експериментальних даних, для встановлення похибки отриманих результатів, обчислювали середньоквадратичного відхилення  $\sigma$  за формулою:

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{(n-1)}}, d = X_i - X_{cp}, \quad (8)$$

де  $d$  – різниця між окремими показниками параметру і середньою-арифметичною величиною ( $X_i - X_{cp}$ );

$n$  – кількість досліджуваних зразків;

$X_i$  – значення параметру для окремого зразка;

$X_{cp}$  – середнє арифметичне параметру всіх досліджуваних зразків [103, 104].

Значення вірогідності отриманих даних обраховували за методикою В.Ю. Урбаха [103] з використанням  $t$ -критерію Ст'юдента та вважали достовірними при рівні значимості  $p < 0,05$ .



## **3 ОПТИМІЗАЦІЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРЛЕЙКІНУ-7 ЛЮДИНИ**

### **3.1 Оптимізація складу живильного середовища для культивування продуцента рІЛ-7**

Один із напрямів підвищення виходу рекомбінантних продуктів у бактеріальних системах біосинтезу адресований до оптимізації складу поживних середовищ. Аналіз наявних публікацій [19, 35, 61, 63, 65, 69, 70, 78, 92, 105] щодо біосинтезу рекомбінантних цитокінів та інших білків у системі експресії на основі *Escherichia coli* свідчить про те, що найбільш вживаними є стандартні середовища LB, YT та TB або ж подібні за складом пептоновмісні середовища. Разом із тим, у багатьох випадках дослідники окремо додають різні мінеральні солі та органічні речовини у різних концентраціях [19, 35, 63, 69, 70], а також вітаміни та вітаміноподібні речовини [78, 106, 107]. У більшості випадків автори не наводять експериментальних даних, які б підтверджували доцільність застосування використаного якісно-кількісного складу поживного середовища. Для визначення оптимального складу живильних середовищ можуть бути використані різні методичні підходи, проте до найбільш розповсюджених відносяться метод Бокса-Вілсона, повний та дробовий факторний експерименти [93, 105, 108-110].

#### **3.1.1 Оптимізація кількісного вмісту компонентів базового живильного середовища**

Оптимізацію складу живильного середовища (ЖС), по кількісному вмісту компонентів проводили в два етапи у відповідності до матриці планування дробового факторного експерименту [93]. У випадку ДФЕ має місце можливість скоротити кількість дослідів за рахунок кореляції між стовпчиками матриці планування, що ускладнює даний етап, проте не впливає на надійність оцінок експерименту. Тому, зважаючи на дані літератури [92, 105, 108-110] та результати

власних попередніх експериментів щодо визначення умов біосинтезу рекомбінантних білків у системі експресії на основі *E. coli* (у тому числі й рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини, рІЛ-7), концепція ДФЕ є цілком прийнятною.

Проаналізувавши різні варіанти матриці планування ДФЕ, ми вирішили розділити процес оптимізації кількісного складу ЖС на два етапи. На першому етапі оптимізували склад середовища по вмісту органічних компонентів – джерела вуглецю:

- пептон;
- дріжджовий екстракт;
- розчин 5052 (лактоза – 10%, гліцерол – 25% та глюкоза – 2,5%);
- 10% розчин D-мальтози.

На другому – проводили оптимізацію кількісного складу мінеральних речовин:

- сульфат магнію  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ;
- сульфат амонію  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;
- дигідрофосфат калію  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;
- гідрофосфат натрію  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ;
- гідрокарбонат натрію  $\text{NaHCO}_3$ .

У всіх досліджуваних варіантах ЖС до останнього додавали хлорамфенікол в фіксованій кількості. При проведенні дослідів із оптимізації кількості органічних компонентів неорганічні солі додавали в кількостях, що відповідають базовому варіанту складу середовища [64]. При проведенні дослідів по оптимізації мінеральних речовин використовували кількість органічних компонентів, визначену як оптимальну в рамках першого етапу робіт. Як контрольні точки було обрано кількість накопиченої біомаси клітин (концентрацію клітин визначали по оптичній густині культуральної рідини) та вихід рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини, який отримували в процесі вирощування бактерій штаму *Escherichia coli* BL21(DE3). Кожен дослід проводили в трьох повторах, а для подальших розрахунків брали середнє значення.

Оптимізацію кількісного складу органічних компонентів ЖС проводили із використанням матриці дробно-факторного експерименту ДФЕ<sup>4-1</sup> (табл. 3.1). Вивчали вплив на вихід біомаси ( $y_1$ ) та на синтез рІЛ-7 ( $y_2$ ) таких факторів:

- $x_1$  – пептон, г/л;
- $x_2$  – дріжджовий екстракт, г/л;
- $x_3$  – розчин 5052 (лактоза – 10%, гліцерол – 25% та глюкоза – 2,5%), мл/л;
- $x_4$  – 10% розчин D-мальтози, мл/л.

Для кожного з чотирьох факторів був визначений інтервал варіювання: для першого фактору – 3-17г/л пептону; для другого – 10-20г/л дріжджового екстракту; для третього – 20-40мл/л розчину 5052 (глюкоза – 10%, гліцерол – 25% та глюкоза – 2,5%); для четвертого 10-50мл/л 10% розчину D-мальтози.

Відповідно до матриці планування провели серію дослідів, на основі яких визначили оптимальне експериментальне співвідношення між органічними компонентами живильного середовища, та вихідні дані для розрахунку лінійних коефіцієнтів регресії, для оптимізації складу середовища для *E. coli* BL21(DE3), наведені у таблиці 3.1. Статистично значимі коефіцієнти регресії факторів моделі дробно-факторного експерименту для бактеріального продуценту рІЛ-7 людини мають такі значення:

- для виходу біомаси –  $b_0 = 1,707$ ,  $b_1 = 0,014$ ,  $b_2 = 0,005$ ,  $b_3 = -0,008$ ,  $b_4 = 0,003$ ;
- для синтезу рІЛ-7 –  $b_0 = 0,783$ ,  $b_1 = 0,003$ ,  $b_2 = 0,002$ ,  $b_3 = -0,002$ ,  $b_4 = 0,001$ .

Тоді, рівняння моделі, що описує процес глибинного культивування штаму *E. coli* BL21(DE3) на оптимізованому середовищі для виходу біомаси та синтезу рІЛ-7, відповідно, має вигляд:

$$\bar{y}_{u1} = 1,707 + 0,014x_1 + 0,005x_2 - 0,008x_3 + 0,003x_4, \quad (9)$$

$$\bar{y}_{u2} = 0,783 + 0,003x_1 + 0,002x_2 - 0,002x_3 + 0,001x_4. \quad (10)$$

Таблиця 3.1 – Дані планування та результати ДФЕ<sup>4-1</sup> щодо оптимізації вмісту органічних компонентів ЖС

Показники	Фактор				Вихід біомаси, о.о. (ОГ <sub>600</sub> )		Вихід рІЛ-7, мг/мл	
	пептон, г/л	дріжджовий екстракт, г/л	розчин 5052, мл/л	10% розчин D- мальтози, мл/л	Дослідний	Теоретичний	Дослідний	Теоретичний
Позначення фактору	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>u1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>u2</sub>
Інтервал варіювання	7	5	10	20	-	-	-	-
Верхній рівень	17	20	40	50	-	-	-	-
Нижній рівень	3	10	20	10	-	-	-	-
Досліди:								
1 (A)*	17	20	40	50	1,9	1,88	0,84	0,829
2 (B)	17	20	20	10	1,9	1,93	0,83	0,849
3 (C)	17	10	40	10	1,7	1,73	0,78	0,784
<b>4 (D)</b>	<b>17</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>50</b>	<b>2,0</b>	<b>1,98</b>	<b>0,86</b>	<b>0,849</b>
5 (E)	3	20	40	10	1,6	1,58	0,77	0,759
6 (F)	3	20	20	50	1,8	1,83	0,82	0,824
7 (G)	3	10	40	50	1,6	1,63	0,74	0,759
8 (H)	3	10	20	10	1,7	1,68	0,79	0,779

Примітки:

1. **Напівжирним** шрифтом виділено найвищі значення;
2. \* – тут і далі латинськими літерами A....H позначено відповідний кількісний склад ЖС.

На основі отриманих рівнянь, було розраховано теоретичні значення для виходу кількості накопиченої біомаси й синтезованого рІЛ-7 при значеннях факторів наведених в таблиці 3.1. Порівнявши отримані теоретичні дані з дослідними встановили, що різниця між теоретичним і практичним показником параметру, що контролюється, не перевищує 5%, для всіх точок, що свідчить про достовірність отриманих даних.

Отримані в результаті ДФЕ<sup>4-1</sup> рівняння регресії пов'язують рівні впливу факторів з виходом біомаси та синтезом рІІ-7, відповідно, в межах області, що вивчається. Найбільший вихід біомаси штаму *E. coli* BL21(DE3) 2,0о.о. (ОГ<sub>600</sub>) (експериментальний) та 1,98о.о. (ОГ<sub>600</sub>) (розрахунковий), і синтез рІІ-7 0,86мг/мл (експериментальний) та 0,849мг/мл (розрахунковий) (табл. 3.1) відбувається при використанні середовища складу D ( $x_1 = 17$  г/л,  $x_2 = 10$  г/л,  $x_3 = 20$  мл/л,  $x_4 = 50$  мл/л). На вихід процесу особливий вплив здійснюють  $x_1$ ,  $x_3$  – концентрація пептону, та розчину 5052 (лактоза – 10%, гліцерол – 25% та глюкоза – 2,5%).

Таким чином, в результаті оптимізації з використанням плану дробно-факторного експерименту отримано рівняння регресії, що описують кількість накопиченої біомаси та синтезованого рІІ-7 штамом *E. coli* BL21(DE3) в глибинній культурі в залежності від кількісного складу органічних компонентів живильного середовища. На рисунках 3.1 та 3.2 представлені графіки порівняння між розрахунковими та дослідними даними по кількості накопиченої біомаси та синтезованого рІІ-7, відповідно.

Оптимізація кількісного складу мінеральних речовин у живильному середовищі проводилася за допомогою матриці дробно-факторного експерименту ДФЕ<sup>5-2</sup> (табл. 3.2). Як і в попередньому випадку, вивчали вплив на вихід біомаси ( $y_1$ ) та на вихід рІІ7 ( $y_2$ ) таких факторів:

- $x_1$  – сульфату магнію  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , г/л;
- $x_2$  – 0,5М розчину сульфату амонію  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , мл/л;
- $x_3$  – 1М розчину дигідрофосфату калію  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , мл/л;
- $x_4$  – 1М розчину гідрофосфату натрію  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , мл/л;
- $x_5$  – гідрокарбонату натрію  $\text{NaHCO}_3$ , г/л.

Для кожного з п'яти факторів був визначений інтервал варіювання: для першого фактора – 3-5г/л  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; для другого – 50-80мл/л 0,5М розчину  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; для третього – 30-50мл/л 1М розчину  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; для четвертого 50-90мл/л 1М розчину  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; для п'ятого – 5-9г/л  $\text{NaHCO}_3$ .

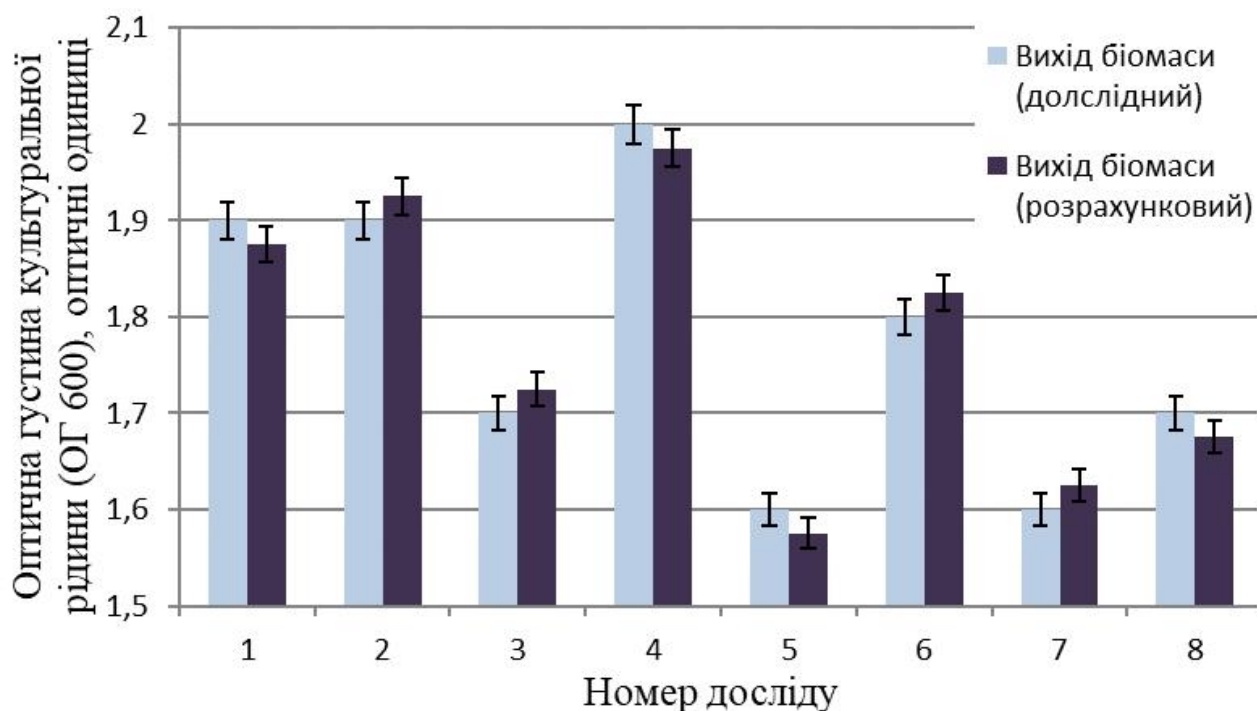


Рисунок 3.1 – Залежність швидкості росту *E. coli* від кількісного складу ЖС (ограничні компоненти):

1 – склад А; 2 – склад В; 3 – склад С; 4 – склад D; 5 – склад Е; 6 – склад F;  
7 – склад G; 8 – склад H

Дослідні значення кількості накопиченої біомаси продуценту та синтезованого рІЛ-7 визначали на основі матриці планування, обираючи для подальших розрахунків середнє значення трьох дослідів. Вихідні дані для розрахунку лінійних коефіцієнтів регресії при оптимізації складу середовища для культивування продуцента рІЛ-7 представлені у таблиці 3.2. Статистично значимі коефіцієнти регресії факторів моделі мають такі значення:

- для виходу біомаси –  $b_0 = 1,842$ ,  $b_1 = 0,013$ ,  $b_2 = -0,001$ ,  $b_3 = 0,009$ ,  
 $b_4 = -0,002$ ,  $b_5 = -0,006$ ;
- для синтезу рІЛ-7 –  $b_0 = 0,810$ ,  $b_1 = 0,006$ ,  $b_2 = -0,001$ ,  $b_3 = 0,003$ ,  
 $b_4 = -0,001$ ,  $b_5 = -0,004$ .

Рівняння моделі, що описує процес глибинного культивування продуцента рІЛ-7 на оптимізованому середовищі для виходу біомаси та синтезу рІЛ-7, відповідно, має вигляд:

$$\bar{y}_{u1} = 1,842 + 0,013x_1 - 0,001x_2 + 0,009x_3 - 0,002x_4 - 0,006x_5, \quad (11)$$

$$\bar{y}_{u2} = 0,810 + 0,006x_1 - 0,001x_2 + 0,003x_3 - 0,001x_4 - 0,004x_5. \quad (12)$$

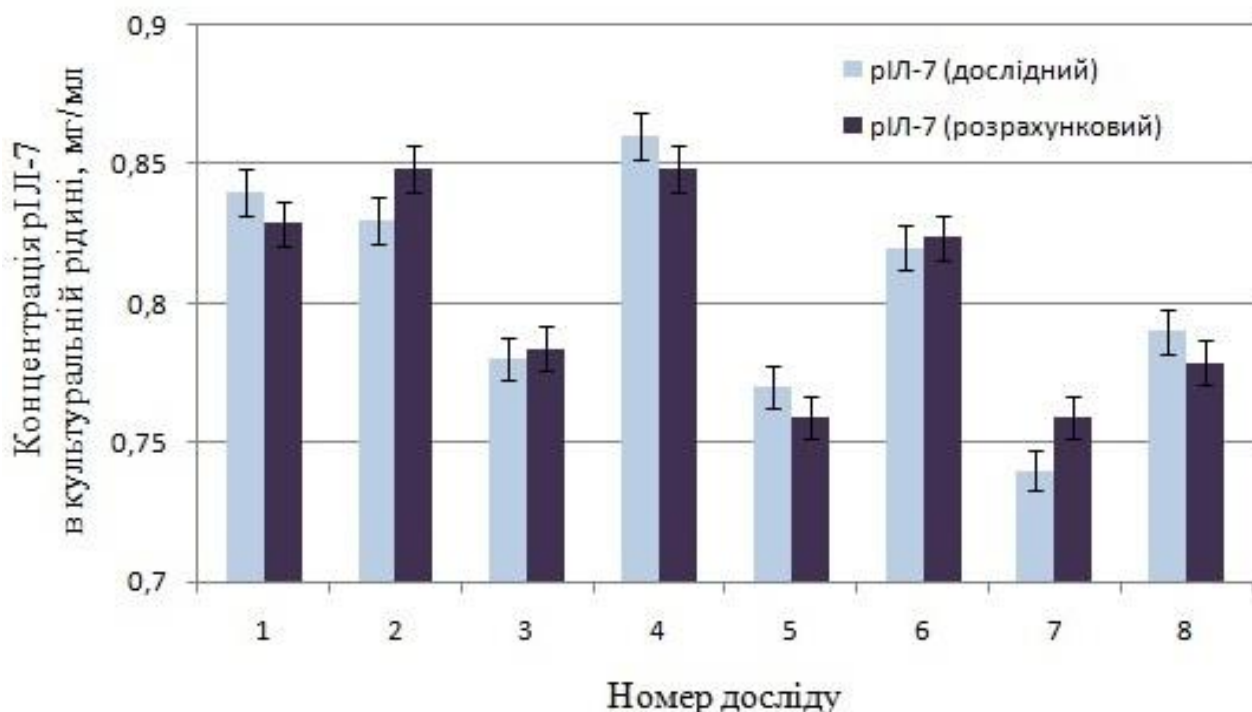


Рисунок 3.2 – Залежність вмісту рІЛ-7 у культуральній рідині від кількісного складу ЖС (органічні компоненти):

1 – склад А; 2 – склад В; 3 – склад С; 4 – склад D; 5 – склад Е; 6 – склад F;  
7 – склад G; 8 – склад Н

За отриманими рівняннями визначили теоретичний вихід біомаси продуценту *E. coli* та кількості синтезованого рІЛ-7. Про адекватність отриманих результатів можемо судити з того, що похибка між теоретичними і дослідними результатами не перевищує 5%. Отримані в результаті ДФЕ 2<sup>5-2</sup> рівняння регресії пов'язують рівні впливу факторів з виходом біомаси та синтезом рІЛ-7, відповідно, в межах області, що вивчається. Найбільший вихід біомаси штаму *E. coli* BL21(DE3) 2,2о.о. (ОГ<sub>600</sub>) (експериментальний) та 2,18о.о. (ОГ<sub>600</sub>) (розрахунковий), і синтез рІЛ-7 0,95мг/мл (експериментальний) та 0,945мг/мл (розрахунковий) (табл.3.2) відбувається при використанні середовища складу К ( $x_1 = 5$  г/л,  $x_2 = 50$  мл/л,  $x_3 = 50$  мл/л,  $x_4 = 50$  мл/л,  $x_5 = 5$  г/л). На кінцевий вихід

процесу біосинтезу особливий вплив здійснюють  $x_1$ ,  $x_5$  – концентрація  $MgSO_4 \times 7H_2O$  та  $KH_2PO_4$ .

Таблиця 3.2 – Дані планування та результати ДФЕ<sup>5-2</sup> щодо оптимізації вмісту мінеральних компонентів ЖС

Показники	Фактор					Вихід біомаси, о.о. (ОГ <sub>600</sub> )		Вихід рІЛ-7, мг/мл	
	$MgSO_4 \times 7H_2O$ , г/л	$(NH_4)_2SO_4$ , мл/л	$KH_2PO_4$ , мл/л	$Na_2HPO_4$ , мл/л	$NaHCO_3$ , г/л	Дослідний	Теоретичний	Дослідний	Теоретичний
Позначення фактору	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	$x_5$	$y_1$	$y_{u1}$	$y_2$	$y_{u2}$
Інтервал варіювання	1	15	10	20	2	-	-	-	-
Верхній рівень	5	80	50	90	9	-	-	-	-
Нижній рівень	3	50	30	50	5	-	-	-	-
Досліди:									
1 (І)*	5	80	50	90	9	2,0	2,05	0,88	0,903
2 (J)	5	80	30	50	9	2,0	1,95	0,89	0,868
<b>3 (К)</b>	<b>5</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>5</b>	<b>2,2</b>	<b>2,18</b>	<b>0,95</b>	<b>0,945</b>
4 (L)	5	50	30	90	5	1,9	1,93	0,84	0,845
5 (M)	3	80	50	50	5	2,1	2,13	0,90	0,905
6 (N)	3	80	30	90	5	1,9	1,88	0,81	0,805
7 (O)	3	50	50	90	9	2,1	2,05	0,94	0,918
8 (P)	3	50	30	50	9	1,9	1,95	0,86	0,883

Примітки:

1. **Напівжирним** шрифтом виділено найвищі значення;
2. \* – тут і далі латинськими літерами І...Р позначено відповідний кількісний склад ЖС.

В результаті досліджень, оптимізації складу ЖС з використанням плану ДФЕ отримано рівняння, що описують кількість накопиченої біомаси та



синтезованого рІІ-7 штамом *E. coli* BL21(DE3) в глибинній культурі в залежності від кількісного складу мінеральних речовин. На рисунках 3.3 та 3.4 представлені графіки порівняння між розрахунковими та експериментальними даними по кількості накопиченої біомаси та синтезованого рІІ-7, відповідно.

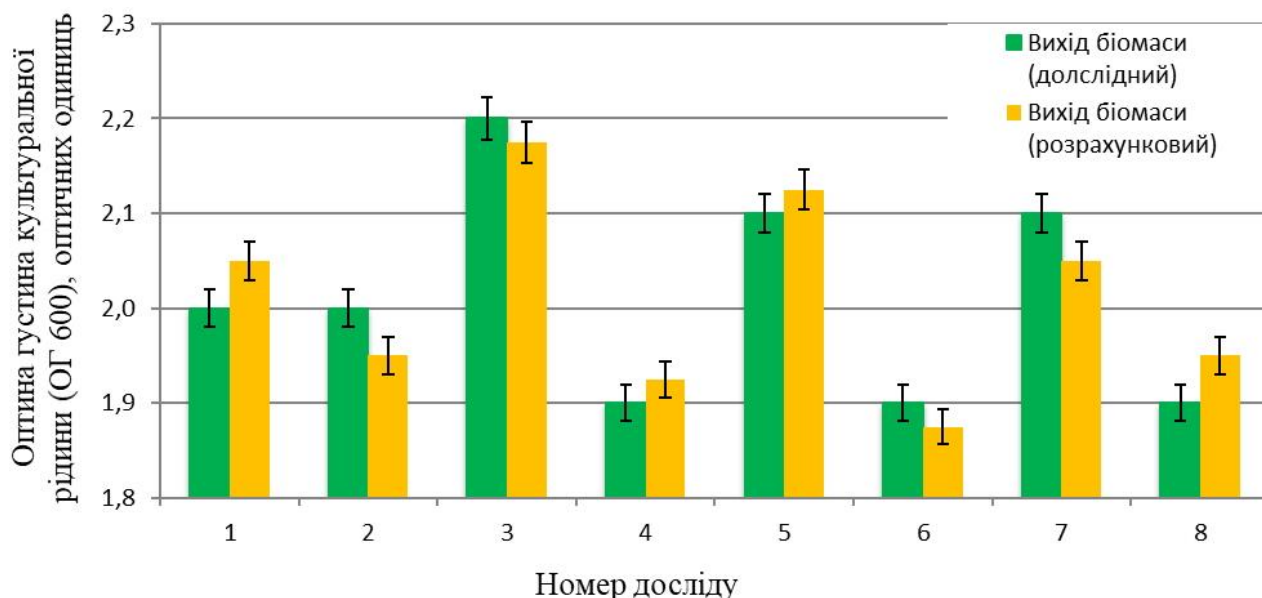


Рисунок 3.3 – Залежність швидкості росту *E. coli* від кількісного складу ЖС (мінеральні компоненти):

1 – склад І; 2 – склад J; 3 – склад К; 4 – склад L; 5 – склад М; 6 – склад N;  
7 – склад О; 8 – склад Р

На основі даних двох проведених дробно-факторних експериментів визначено оптимальний кількісний склад живильного середовища для культивування рекомбінантного штаму *E. coli* BL21(DE3) – продуценту рІІ-7 (табл. 3.3).

За результаті оптимізації кількісного складу живильного середовища нам вдалося збільшити приріст біомаси в 1,4 рази, а вихід рІІ-7 – в 1,3 рази у порівнянні з базовим складом [64].

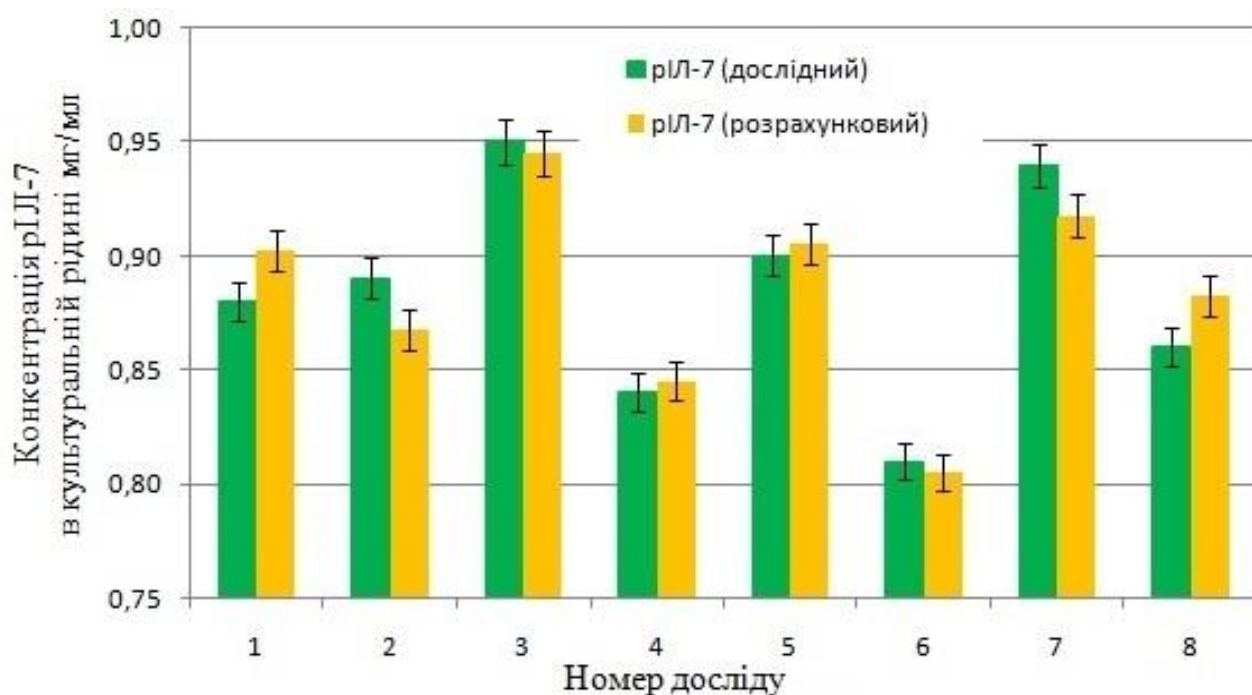


Рисунок 3.4 – Залежність вмісту рІЛ-7 у культуральній рідині від кількісного складу ЖС (мінеральних компоненті):

1 – склад І; 2 – склад J; 3 – склад К; 4 – склад L; 5 – склад М; 6 – склад N;  
7 – склад О; 8 – склад Р

Таблиця 3.3 – Рекомендований склад ЖС для глибинного культивування штаму *E. coli* BL21(DE3) продуценту рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини.

№	Назва компоненту	Кількість компоненту
1	Пептон	17 г/л
2	Дріжджовий екстракт	10 г/л
3	Розчин 5052 (10% лактози, 25 % гліцеролу, 2,5% глюкози)	20 мл/л
4	D-мальтоза (10% розчин)	50 мл/л
5	Сульфат магнію	5 г/л
6	Сульфат амонію (0,5М розчин)	50 мл/л
7	Дигідрофосфат калію (1М розчин)	50 мл/л
8	Гідрофосфат натрію (1М розчин)	50 мл/л
9	Гідрокарбонат натрію	5 г/л
10	Хлорамфенікол	0,173 мг/л

### 3.1.2 Дослідження впливу рослинних екстрактів та вітаміну K<sub>1</sub> на рівень біосинтезу pІЛ-7

Роботи різних авторів свідчать про можливість ефективного застосування рослинних екстрактів в якості стимуляторів росту бактеріальних клітин, а також синтезу бактеріями певних продуктів, в т.ч. і рекомбінантних білків [65, 69, 105]. У роботі [78] було показано стимулюючу дію на ріст рекомбінантних бактерій *E. coli* і біосинтез ними рекомбінантного білка теплового шоку *Chlamydia trachomatis* HSP-60 екстрактів двох рослин сімейства амарилісових – клівії кіноварної *Clivia miniata* і зефірантесу великоквіткового *Zephyranthes grandiflora* (у вигляді добавки до ЖС в діапазоні 0,5-1,0%). У літературі [78] описано можливість стимуляції росту шигелл та стафілококів при додаванні до живильного середовища вітаміну K<sub>1</sub>. Аналіз згаданих вище літературних джерел привів нас до думки про доцільність оцінки застосування екстрактів таких рослин в складі ЖС при культивуванні *E. coli* для збільшення виходу рекомбінантного ІЛ-7 людини наступних добавок: екстракту клівії кіноварної *Clivia miniata*, екстракту зефірантесу великоквіткового *Zephyranthes grandiflora* та вітаміну K<sub>1</sub>.

Для характеристики рослинних екстрактів на першому етапі дослідження проводили визначення вмісту певних груп біологічно активних речовин, а саме: білків, вуглеводів, алкалоїдів. Вибір даних речовин для характеристики рослинних екстрактів був проведений за результатами аналізу літературних і власних даних щодо фармакогностичного вивчення відповідних рослин [78, 100, 111-114]. Результати фітохімічної характеристики рослинних екстрактів наведено в таблиці 3.4.

Як базове ЖС використовували середовище оптимізоване вище. Культивування проводили при сталій температурі 37,5°C, швидкості перемішування 200об/хв; тривалість культивування становила 17год [92].

Для оцінки впливу рослинних екстрактів (діапазон концентрацій 0,1-5,0%) та вітаміну K<sub>1</sub> (діапазон концентрацій 5÷25мг/мл) на ріст клітин *E. coli* штаму BL21 (DE3) та рівень синтезу pІЛ-7 проводили визначення концентрації

бактерійних клітин на момент закінчення культивування та вміст цільового продукту у культуральній рідині.

Таблиця 3.4 – Фітохімічна характеристика рослинних екстрактів

Біологічно активні речовини	Екстракт	
	Клівія кіноварна	Зефірантес великоквітковий
Білки, %	0,45	0,87
Вуглеводи, %	0,58	0,72
Алкалоїди (у перерахунку на лікорин), %	0,06	0,08

Примітка. Наведено середньоарифметичні результати трьох визначень.

Як вже зазначалося, в літературі описано результати низки експериментів по впливу вітаміну  $K_1$  на зростання шигел та стафілококів [75], а також на синтез рекомбінантного білка HSP-60 *Ch. trachomatis* [78]. У першому випадку були отримані позитивні результати – вітамін  $K_1$  посилював ріст патогенних мікроорганізмів. У разі ж синтезу бактеріями *E. coli* рекомбінантного білка-антигену не було отримано стимулюючого ефекту вітамінної добавки в діапазоні концентрацій 5-25мг на 1мл ЖС. Відсутність впливу на біосинтетичні процеси вітаміну К могла бути обумовлена високим рівнем ліпофільності вітаміну  $K_1$  та складністю підтримки його концентрації у ЖС на належному рівні. Також слід зазначити, що за наявними даними [115] лікорин, одна із найбільш досліджених біологічно активних речовин рослин родини амарилісових, яка, ймовірно, викликає описаний у літературі вплив на ріст та біосинтетичну активність рекомбінантних *E. coli* [78], погано розчинний у воді та органічних розчинниках. Тому не виключено, що біодоступність лікорину з рослинних екстрактів для рекомбінантних бактерій не є максимальною. У зв'язку із викладеним вище у наших дослідженнях було використано також й ліпосомальні форми вітаміну  $K_1$  та рослинних екстрактів, які отримували за методикою, розробленою [98]. Результати відповідних досліджень наведені в таблиці 3.5, 3.6.

Таблиця 3.5 – Вплив рослинних екстрактів на вихід біомаси *E. coli* та рекомбінантного білка рІЛ-7

Концентрація добавки до поживного середовища	Варіант введення добавки	Концентрація культури у досліді*, о.о. (ОГ <sub>600</sub> )*	Концентрація рІЛ-7 у культуральній рідині**, мг/м	Частка рІЛ-7 від загальної кількості бактерійних білків***, %
Екстракт клівії кіноварної				
0,1%	Базовий	2,8	0,97	16
	Ліпосоми	3,1	1,02	19
0,5%	Базовий	3,0	1,23	17
	Ліпосоми	2,9	1,33	21
1,0%	Базовий	2,8	0,96	18
	Ліпосоми	2,4	0,95	15
5,0%	Базовий	2,3	0,89	9
	Ліпосоми	2,2	0,82	8
Контроль (без екстракту та СФХ)		2,2	0,95	12
Контроль (без екстракту, з СФХ)		2,2	0,94	12
Екстракт зефірантесу великоквіткового				
0,1%	Базовий	2,8	0,97	17
	Ліпосоми	3,4	1,25	19
0,5%	Базовий	3,3	1,25	18
	Ліпосоми	3,0	1,19	22
1,0%	Базовий	2,7	0,99	17
	Ліпосоми	2,3	1,05	14
5,0%	Базовий	2,1	0,88	9
	Ліпосоми	2,1	0,74	8
Контроль (без екстракту та СФХ)		2,2	0,95	12
Контроль (без екстракту, з СФХ)		2,2	0,94	12

Примітки:

1. \* – середнє значення параметра по результатах трьох дослідів.
2. \*\* – рівень достовірної різниці між результатами дослідів та контролю складає  $P < 0,05$ .
3. \*\*\* – рівень достовірної різниці між результатами дослідів та контролю складає  $P < 0,01$ .

Слід зазначити, що для двох досліджуваних рослинних екстрактів було виявлено стимулюючий вплив на ріст культури і вміст рекомбінантного білка у діапазоні концентрацій 0,1÷1%. При цьому при використанні звичайних екстрактів (базовий варіант) найкращі результати було зафіксовано при внесенні у ЖС екстрактів у концентрації 0,5%. У той же час, коли при внесенні ліпосомальних форм екстрактів найвищий результат фіксували вже при концентрації 0,1% (рис. 3.5-3.8). Такі дані свідчать про те, що використання ліпосомальних форм екстрактів впливало на біодоступність біологічно активних речовин рослинного походження для бактерійних клітин. Разом із тим, слід зазначити, що навряд чи доцільно рекомендувати використання такого прийому для подальшого використання, адже, наприклад, у випадку додавання до ЖС екстракту клівії кіноварної (0,1-0,5%) зростання концентрації рІІ-7 спостерігалось лише у 1,05-1,08 раз (рис. 3.6), а у випадку додавання до поживного середовища екстракту зефірантесу великоквіткового у концентрації 0,1% (ліпосомальна форма) та у концентрації 0,5% (базовий варіант) було отримано співставні результати (рис. 3.8). Загалом, використання фітодобавок до поживного середовища дозволило підвищити вміст цільового продукту у культуральній рідині у 1,3-1,4 рази. Зазначимо також, що для обох, використаних у дослідженні, рослинних екстрактів у діапазоні концентрацій 0,1-1,0% спостерігалось підвищення частки цільового продукту серед всіх білків бактеріальної клітини (рис. 3.6 та 3.8). Такі результати є, на нашу думку, цілком позитивними та можуть бути використані при виробничому культивуванні продуцента.

Окремо слід звернути увагу, що при використанні відносно великих концентрацій фітоекстрактів було зафіксовано інгібувальний вплив на ростові та біосинтетичні властивості бактеріального продуценту. Загалом у літературі описано інгібувальну дію даної речовини на процеси синтезу білка у вищих рослин, тварин та водоростей, а також різноманітний (інгібувальний чи стимулюючий) вплив на ріст різних видів та родів дріжджів [116]. Діапазони інгібувального та стимулюючого впливу рослинних екстрактів узгоджуються із

відомими даними [78]. Додатково зазначимо, що із ймовірним підвищенням рівня доступності біологічно активних речовин рослинного походження для бактеріальної клітини спостерігалось зменшення границі токсичного впливу фітоекстрактів (рис. 3.5-3.8). Такі дані, додатково, свідчать про недоцільність використання ліпосомальних форм рослинних екстрактів як прийому підвищення біосинтеричних властивостей продуцента.

Таблиця 3.6 – Вплив вітаміну K<sub>1</sub> на вихід біомаси *E. coli* та рекомбінантного білка pIL-7

Концентрація добавки до поживного середовища	Варіант введення добавки	Концентрація культури у досліді*, о.о. (ОГ <sub>600</sub> )	Концентрація pIL-7 у культуральній рідині**, мг/мл	Частка pIL-7 від загальної кількості бактерійних білків***, %
Вітамін K <sub>1</sub>				
5мг/мл	Базовий	2,4	0,95	15
	Ліпосоми	2,4	1,01	17
10мг/мл	Базовий	2,5	0,96	17
	Ліпосоми	2,6	1,21	18
15мг/мл	Базовий	2,5	0,96	17
	Ліпосоми	2,8	1,29	22
25мг/мл	Базовий	2,6	0,92	18
	Ліпосоми	2,8	1,33	21
Контроль (без екстракту та СФХ)		2,4	0,96	12

Примітки:

1. \* – середнє значення параметра по результатам трьох дослідів.
2. \*\* – рівень достовірної різниці між результатами дослідів та контролю складає  $P < 0,05$ .
3. \*\*\* – рівень достовірної різниці між результатами дослідів та контролю складає  $P < 0,01$ .

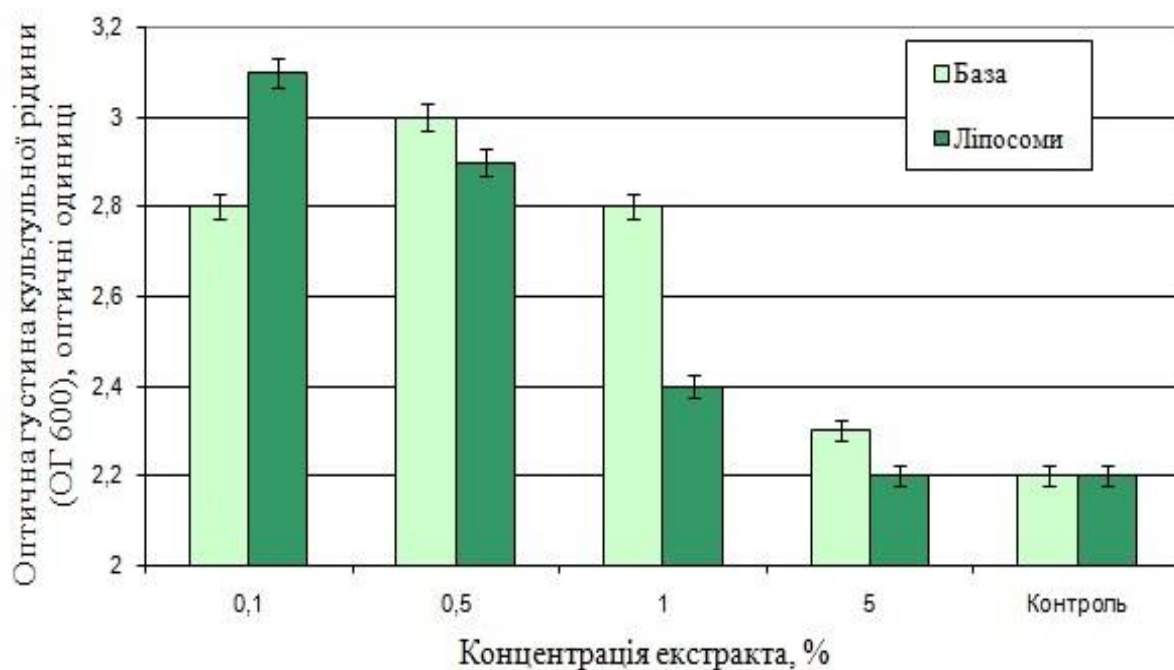


Рисунок 3.5 – Залежність швидкості росту *E. coli* від вмісту екстракту клівії кіноварної у ЖС

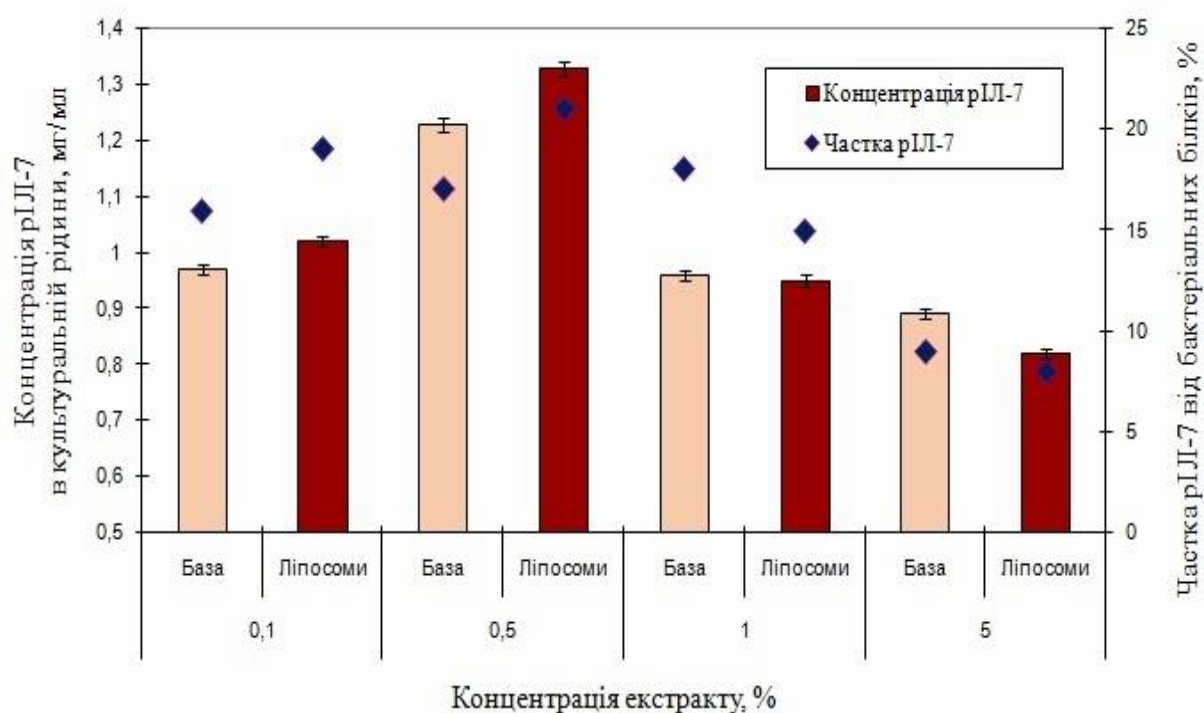


Рисунок 3.6 – Залежність вмісту рІЛ-7 у культуральній рідині від концентрації екстракту клівії кіноварної у ЖС



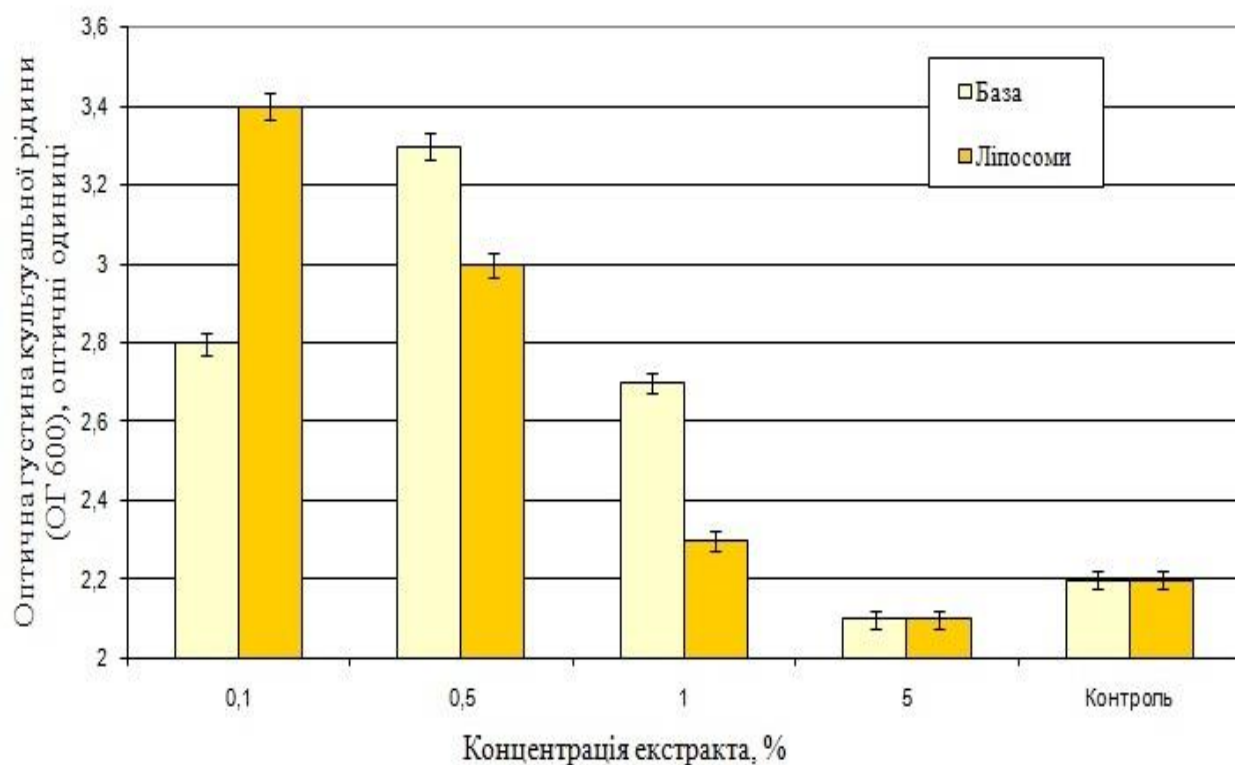


Рисунок 3.7 – Залежність швидкості росту *E. coli* від вмісту екстракту зефірантесу великоквіткового у ЖС

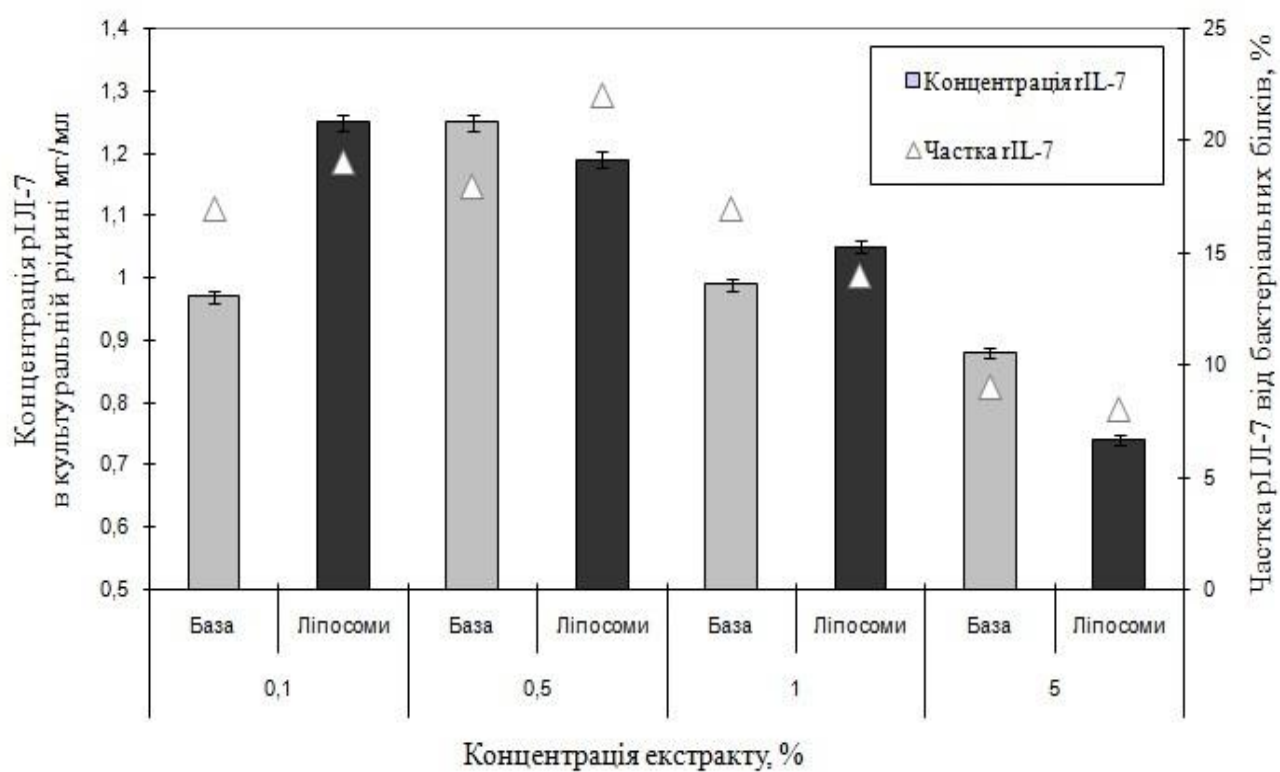


Рисунок 3.8 – Залежність вмісту рІЛ-7 у культуральній рідині від концентрації екстракту зефірантесу великоквіткового у ЖС

Окремого аналізу потребують результати щодо виходу біомаси та рІЛ-7 від концентрації вітаміну  $K_1$  у ЖС (рис. 3.9 та 3.10). За використання, як добавки до живильного середовища, звичайного вітаміну  $K_1$  не було зафіксовано стимулюючого впливу ні на ріст культури, ні на синтез нею цільового продукту, що повністю корелює із раніше опублікованими даними щодо дослідження властивостей рекомбінантного продуцента білка-аналога HSP-60 *Ch. trachomatis* [78]. У той же час, за використання ліпосомальної форми вітаміну  $K_1$  було зафіксовано поступове збільшення як виходу біомаси (у 1,2 рази), так і вмісту цільового продукту (у 1,34-1,39 рази). Такі результати свідчать, що використання ліпосомальної форми вітаміну дозволило помітно підвищити його доступність для бактерійної клітини, а рівень підвищення вмісту рІЛ-7 у культуральній рідині при застосуванні такого прийому дає можливість рекомендувати включення ліпосомальної форми вітаміну  $K_1$  до складу ЖС.

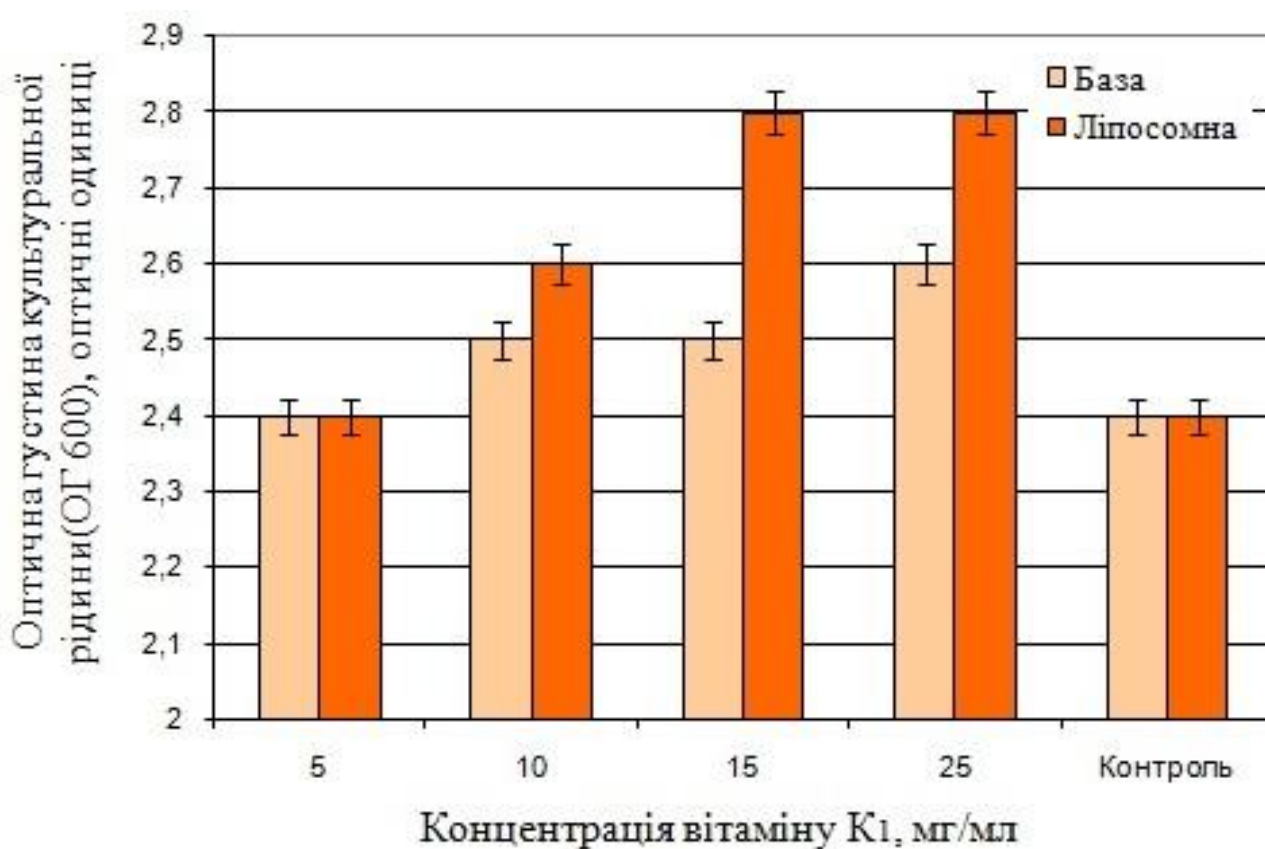


Рисунок 3.9 – Залежність швидкості росту *E. coli* від вмісту вітаміну  $K_1$  у ЖС

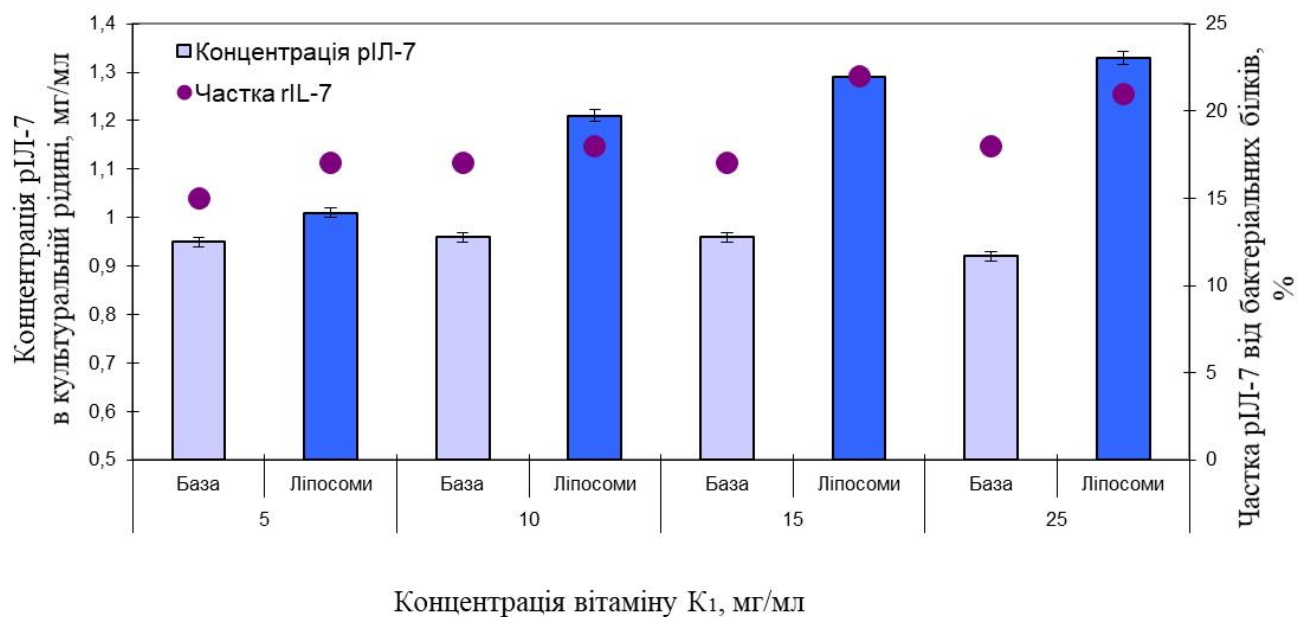


Рисунок 3.10 – Залежність вмісту рІЛ-7 у культуральній рідині від концентрації вітаміну K<sub>1</sub> у ЖС

### 3.2 Дослідження механізмів впливу рослинних екстрактів на біосинтетичну активність продуцента рІЛ-7

Оскільки, попередні дослідження показали ефективність екстрактів клівії кіноварної і зефірантесу великоквіткового як добавок до живильного середовища при культивуванні *E. coli* – продуцента рІЛ-7, то було доцільно дослідити механізми, які обумовлюють відповідну біологічну активність фітоекстрактів. У роботах [76, 77] було встановлено, що при взаємодії з клітинами *E. coli* екстракту рослини *Ungernia victoris* принаймні одна з мішеней знаходиться в плазматичній мембрані бактеріальної клітини. Тому відправною точкою для наших подальших досліджень було припущення про можливість взаємодії компонентів рослинних екстрактів з поверхневими структурами *E. coli*. Для вивчення механізмів такої взаємодії нами був використаний метод подібний фаготипуванню бактерій і дозволяє оцінити структурно-фізіологічний стан клітинної стінки бактерії при її взаємодії з речовинами різного походження [76, 78]. У разі наявності взаємодії між даними досліджуваними речовинами і певними поверхневими структурами бактерії (зокрема, ліпополісахаридами і білками зовнішньої мембрани клітинної

оболонки) буде спостерігатися зниження рівня адсорбції бактеріофагів на поверхні клітини і, відповідно, зменшення ефективності посіву бактеріофагів. Оскільки адсорбція бактеріофагів відбувається специфічним чином, при взаємодії з відомими поверхневими структурами бактеріальної клітини, то даний підхід може надати цінну інформацію про молекулярні механізми взаємодії рослинних екстрактів з клітинами *E. coli*.

При плануванні даних експериментів ми обрали шість бактеріофагів, які мають різні молекулярні мішені на поверхні *E. coli*, а саме: T7 (абсорбується на ліпополісахаридах),  $\lambda$  (абсорбується на білку LamB), Oх2 (абсорбується на білку OmpA), Oх2h12 (абсорбується на білках OmpA і OmpC), TuIb (абсорбується на білку OmpC) і T2 (абсорбується на білку OmpF) [117-121]. Результати вивчення впливу рослинних екстрактів на ефективність посіву різних бактеріофагів представлені в таблиці 3.7.

Таблиця 3.7 – Вплив рослинних екстрактів на ефективність посіву бактеріофагів

Походження екстракту	Бактеріофаги						F-тест
	T7	$\lambda$	Oх2	Oх2h12	TuIb	T2	
Клівія кіноварна	108 $\pm$ 4	100 $\pm$ 2	108 $\pm$ 8	82 $\pm$ 2	80 $\pm$ 5	89 $\pm$ 4	$\beta > 0,95$
Зефірантес великоквітковий	98 $\pm$ 5	104 $\pm$ 5	99 $\pm$ 8	65 $\pm$ 8	74 $\pm$ 8	92 $\pm$ 4	$\beta > 0,95$

Примітки:

1. В таблиці наведені середні значення і їх стандартні відхилення ( $M \pm m$ ), у відсотках, відносно контролю;
2. Кожен дослід виконано у 4-х повторностях.

За отриманими результатами, досліджувані бактеріофаги можна умовно розділити на дві групи: I - бактеріофаги T7,  $\lambda$  і Oх2, II - бактеріофаги Oх2h12, TuIb і T2. Для бактеріофагів I групи середнє значення ефективності посіву становить 105,3 $\pm$ 6%, а II групи – 84,5 $\pm$ 5%, що свідчить про наявність статистично достовірних відмінностей між даними групами бактеріофагів (при оцінці за t-критерієм Стьюдента –  $P < 0,01$ , і F-критерієм Фішера –  $\beta > 0,95$ ). Відзначимо, що для кожного рослинного екстракту також було зафіксовано статистично достовірні відмінності ефективностей посіву бактеріофагів I і II груп. Таким

чином, можна стверджувати, що в присутності екстрактів клівії кіноварної і зефірантесу великоквіткового бактеріофаги Oх2h12, TuIb і T2 достовірно знижують ефективність посіву в порівнянні з контролем. Відомо, що рецептори даних бактеріофагів входять в групу поринів зовнішньої мембрани оболонки *E. coli* [117-120, 122]. Швидше за все, зниження ефективності посіву для даних бактеріофагів відбувається через взаємодію речовин, що містяться в рослинних екстрактах, з фаговими рецепторами бактеріальної клітини.

Цікаві результати були отримані при дослідженні впливу екстракту зефірантесу великоквіткового на взаємодію бактерії з бактеріофагом Oх2h12 в порівнянні з аналогічними результатами для бактеріофага TuIb. Як відомо перший з них (Oх2h12) має два клітинних рецептора – білки OmpA і OmpC, в той час як бактеріофаг TuIb взаємодіє тільки з білком OmpC. На відміну від раніше отриманих даних на прикладі продуцента рекомбінантного білка теплового шоку HSP-60 *Ch. trachomatis* [121] в рамках актуальних експериментів не було отримано статистично достовірних відмінностей між зниженням ефективності посіву для бактеріофага Oх2h12 ( $65\pm 8\%$ ) і TuIb ( $74\pm 8\%$ ). Однак, були отримані статистично достовірні відмінності між результатами експериментів з бактеріофагом T2 ( $92\pm 4\%$ ) і бактеріофагами Oх2h12 і TuIb ( $69,5\pm 8\%$ ). Найбільш ймовірним є саме механізм конкуренції речовин рослинного походження за зв'язування з клітинними рецепторами. До такого висновку можна прийти аналізуючи результати робіт інших авторів [123-125] з вивчення механізмів експресії білків OmpA, OmpC і OmpF кліткою *E. coli*. Зміна в співвідношенні експресії цих білків може спостерігатися при наявності в живильному середовищі надлишкових (великих) кількостей хлоридів натрію і калію (300ммоль/л), а також вуглеводів, зокрема сахарози (600ммоль/л). З огляду, на результати власних фітохімічних досліджень (табл. 3.6) і даних літератури [100, 111-113] неможливо прийти до висновку про наявність в досліджуваних рослинних екстрактах критичних кількостей даних біологічно активних речовин для зміни співвідношення експресії білків OmpA, OmpC і OmpF *E. coli*. Відзначимо, що не слід повністю виключати ймовірність того, що інші речовини рослинних

екстрактів впливають на співвідношення експресії білків-рецепторів бактеріофагів.

### **3.3 Розробка методу імуноафінної хроматографії для очистки рІЛ-7**

Для білків терапевтичного призначення пред'являються суворі вимоги до чистоти, що обумовлено вимогами керівних документів [126] до чистоти відповідних субстанцій та готових лікарських форм. При розробці субстанцій (особливо – біотехнологічного походження) слід звертати особливу увагу на її призначення, адже для різних готових лікарських форм пред'являються різні вимоги щодо допустимого вмісту активного фармацевтичного інгредієнта (АФІ) та домішок, обумовлених як деградацією АФІ, так і технологічними причинами (наприклад, вміст бактерійних ендотоксинів, що є вкрай актуальним для технологій рекомбінантних білків, отримуваних мікробним синтезом).

Виходячи із вищенаведеного задача розробки високоспецифічних методів очистки рекомбінантних білків терапевтичного призначення є вкрай актуальною. Зазначимо також, що розроблювана нами технологія субстанції рІЛ-7 має забезпечувати отримання АФІ, придатного для виготовлення з неї стерильних лікарських форм.

Описані нашими колегами [92] та використовувані у нашій технології методи іонообмінної та молекулярно-ситової хроматографії дають змогу виконати вимоги керівних документів у випадку отримання продукту неін'єкційного використання. Для вирішення поставленої перед нами задачі необхідно застосування (як додаткового етапу) більш специфічних методик, до яких, в першу чергу, відноситься імуноафінна хроматографія [127, 128].

У науковій літературі [129-131] представлено результати розробок різноманітних імуноафінних сорбентів, які передбачають визначення оптимальних (раціональних) моноклональних антитіл (мАт) із певної панелі та проведення оптимізації умов сорбції та десорбції цільової речовини. У даному випадку можна використовувати один або декілька носіїв для отримання

імуноафінних колонок, адже за даними [132] такий підхід також може приводити до позитивних результатів у сенсі отримання більш ефективних (краще вилучення цільової речовини) та більш стабільних (більша кількість циклів роботи імуноафінної колонки без суттєвого зменшення її ефективності) імуноафінних сорбентів.

З огляду на літературні дані [129-132] ми вирішили зупинитися на двох видах сорбентів-основ для розробки власної імуноафінної колонки – сефарозі 6В та тетраетоксисиланіну (ТЕОС). Перший являє собою полімер агарози [133], а другий відноситься до групи алкілсиланів.

Агарозний полімер був доступний у комерційному виді (сефароза 2В), а полімер ТЕОС отримували за методикою [132], яка містила 2 етапи та передбачала утворення золю на основі ТЕОС у кислотному середовищі під впливом ультразвуку, а також іммобілізацію мАт до отриманої кремнійорганічної матриці. Для обох сорбентів оцінювали динаміку іммобілізації анти-rІІ-7 мАт 325D2 шляхом визначення їх кількісного визначення методом непрямого імуноферментного аналізу (ІФА) у реакційному буферному розчині (рис. 3.11). При постановці ІФА проби з реакційної суміші розводили 1:400 та порівнювали із сигналом контрольного розчину відповідного мАт.

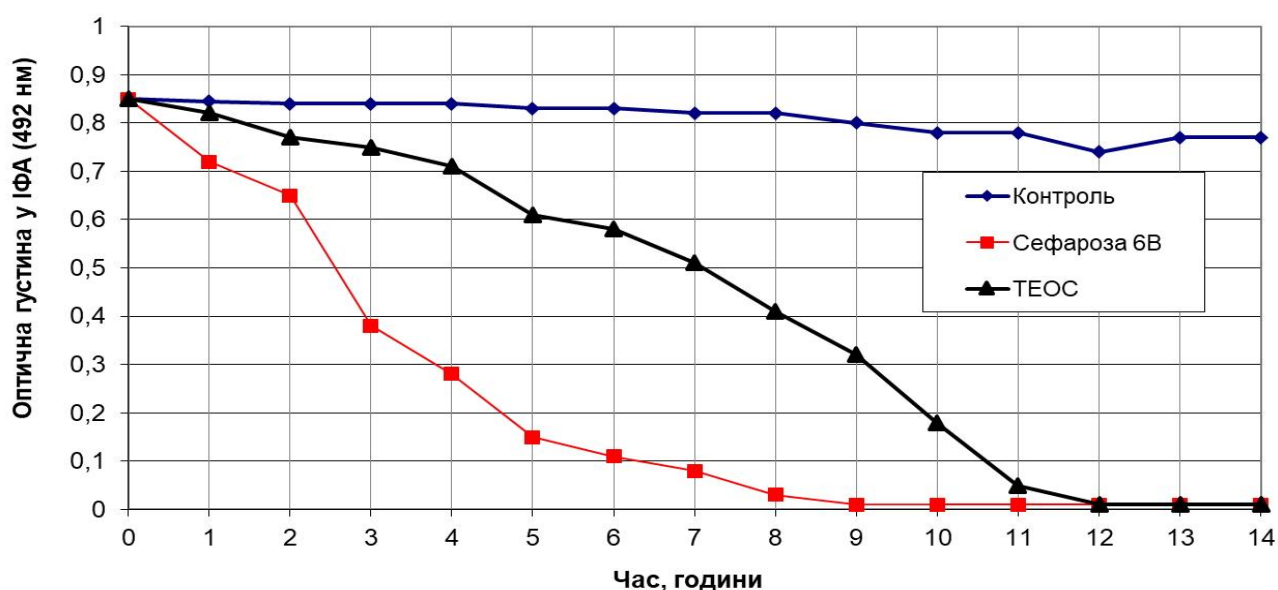


Рисунок 3.11 – Динаміка іммобілізації анти-rІІ-7 мАт 325D2 на різних матрицях-сорбентах

Як це видно з рис. 3.12 для обох сорбентів за 12 годин іммобілізації досягається 99% вилучення (іммобілізації) антитіл із реакційного розчину, що є цілком прийнятним з технологічних позицій. Оскільки під час даних експериментів й сефароза В6, й тетраетоксисилан засвідчили прийнятні динамічні характеристики іммобілізації мАт, подальші дослідження із розробки методики специфічного виділення рІЛ-7 проводили одночасно для двох імуноафінних хроматографічних колонок.

Подальші дослідження щодо відпрацювання протоколу імуноафінної хроматографії проводили для колонок із різними матрицями-основами та різними мАт, що були доступні у нашій лабораторії (табл. 3.8).

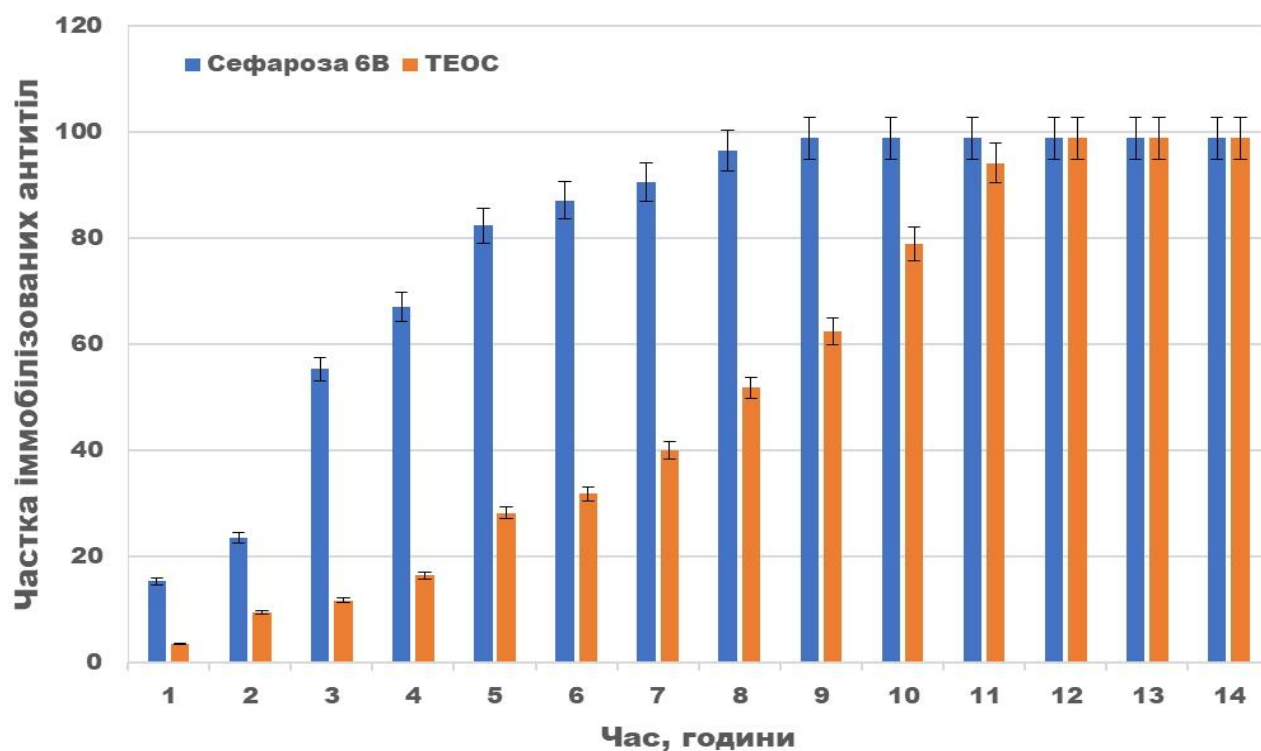


Рисунок 3.12 – Зміна частки іммобілізованих анти-рІЛ-7 мАт 325D2 на різних матрицях-сорбентах під час синтезу імуноафінної колонки

Таблиця 3.8 – Характеристика мАт проти рІЛ-7

Назва МАТ	ОГ <sup>1)</sup> у ТІФА	Ізотип	Титр у КР <sup>1)</sup>	Константа афінності <sup>1)</sup> , 10 <sup>9</sup> М <sup>-1</sup>
314B5	2,571	IgG <sub>2a</sub>	1:1600	16,0
325D2	2,755	IgG <sub>2a</sub>	1:1600	12,0



Для оцінки ефективності синтезованих імуноафінних колонок (ІАК) використовували такі показники як активність зв'язування рІЛ-7 із розчину та чистота препарату рІЛ-7 після елюювання з колонки зв'язаної фракції. У даній серії експериментів використовували низку розчинів для елюції, що використовувалися іншими авторами [129, 130, 132], а саме: цитратно-фосфатний буферний розчин (ЦФР), рН 2,0-2,4, 4М розчин  $MgCl_2$  та 8М розчин сечовини, рН 2,0-2,4.

Отримані експериментальні дані щодо аналітичних характеристик синтезованих імуноафінних колонок представлено у таблиці 3.9 та на рисунку 3.13. Представлені результати свідчать про цілком задовільний рівень вилучення цільового продукту (рІЛ-7) із буферного розчину. Слід зазначити, що у випадку ІАК на основі мАт 325D2 було отримано дещо кращі результати, ніж для колонки, що містила мАт 314B5. У даній серії експериментів імуноафінний сорбент на основі ТЕОС продемонстрував вищі ступені вилучення рІЛ-7. Найбільш ефективним виявився варіант хроматографічної очистки №12. Звертає на себе й той факт, що показники вилучення цільового продукту у випадку ІАХ на основі мАт 325D2 (№№ 4, 5, 6, 10, 11, 12) були вищими у порівнянні із аналогічними результатами при використанні мАт 314B5 (№№ 1, 2, 3, 7, 8, 9). Так, середнє значення ступені вилучення рІЛ-7 для всіх сорбентів із мАт 325D2 та всіх варіантів елюції склав 90,0%. Натомість такий же показник для ІАХ із мАт 325D2 був рівний 92,8%.

Для практичного використання синтезованої ІАК важливим є її стабільність, яка опосередкована наступними характеристиками [132]: по-перше, вплив багатократного використання колонки на ступінь вилучення рІЛ-7, по-друге, вплив різних концентрацій рІЛ-7 на ступінь його вилучення із розчину, й, по-третє, наявність вимивання іммобілізованих мАт при промиванні ІАК різними розчинами.

Таблиця 3.9 – Порівняльна характеристика різних імуноафінних колонок

Матриця-сорбент	мАт	Елюент	Варіант	Кількість рІЛ-7, що наноситься на ІАК, мкг	Кількість рІЛ-7 у фракції, що не зв'язалася з ІАК, мкг	Кількість рІЛ-7 у елюаті, мкг
Сефароза 6В	314В5	ЦФР	1	5	0,55±0,03	4,45±0,22
		Сечовина	2	5	0,48±0,02	4,52±0,23
		MgCl <sub>2</sub>	3	5	0,47±0,02	4,52±0,23
	325D2	ЦФР	4	5	0,35±0,02	4,65±0,23
		Сечовина	5	5	0,33±0,02	4,65±0,23
		MgCl <sub>2</sub>	6	5	0,32±0,02	4,65±0,23
Тетраетокси-силан	314В5	ЦФР	7	5	0,51±0,03	4,49±0,22
		Сечовина	8	5	0,47±0,02	4,53±0,23
		MgCl <sub>2</sub>	9	5	0,51±0,03	4,49±0,22
	325D2	ЦФР	10	5	0,39±0,02	4,61±0,23
		Сечовина	11	5	0,45±0,02	4,54±0,23
		MgCl <sub>2</sub>	12	5	0,25±0,01	4,75±0,24

Примітка. Представлено середні арифметичні значення результатів трьох циклів хроматографії для кожного з варіантів та стандартне відхилення.

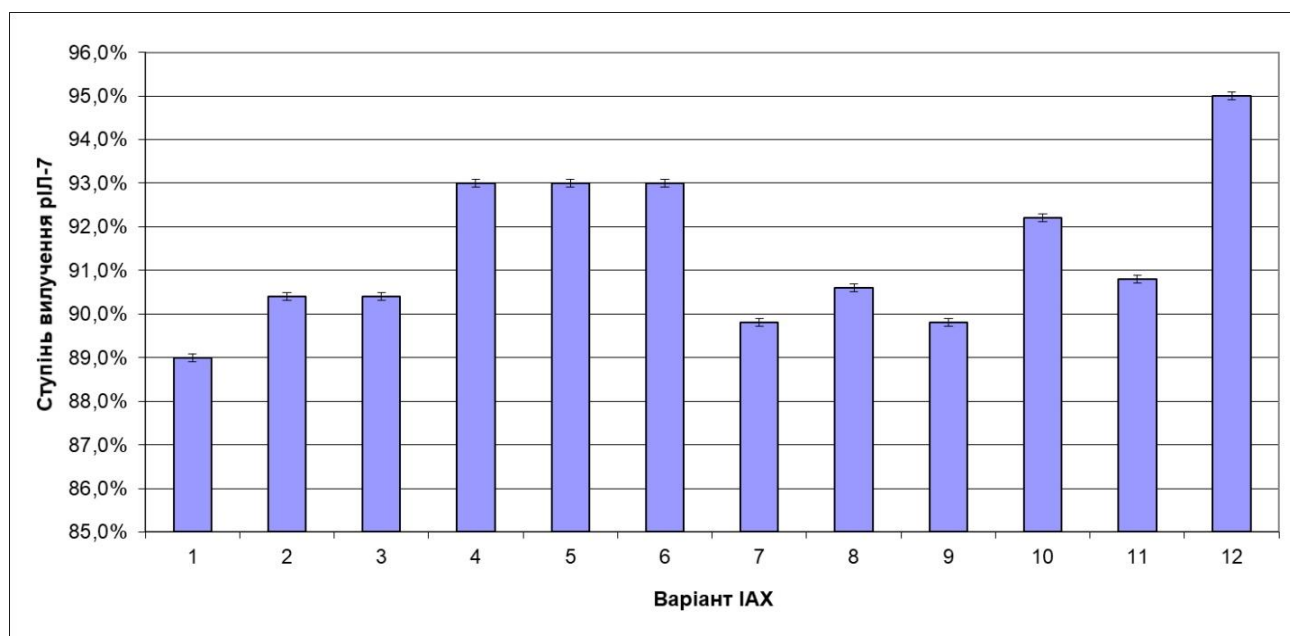


Рисунок 3.13 – Ступені вилучення рІЛ-7 із розчину на різних ІАХ та при різних умовах елюції

Для оцінки стабільності показника вилучення цільової речовини в процесі роботи ІАК проводили 25 циклів хроматографічної очистки, використовуючи два різновиди ІАК (варіанти №№ 6 та 12, табл. 3.9) – на основі сефарози 6В та ТЕОС. Результати проведеного дослідження, що представлені на рисунку 3.14, свідчать, що імуноафінна колонка на основі сефарози 6В дещо поступається стабільністю ІАК на основі ТЕОС: упродовж перших 11 циклів роботи обидві колонки характеризувалися співставними показниками вилучення, натомість з 12 по 17 цикл спостерігалось більш інтенсивне спадання ефективності роботи колонки на основі сефарози 6В.

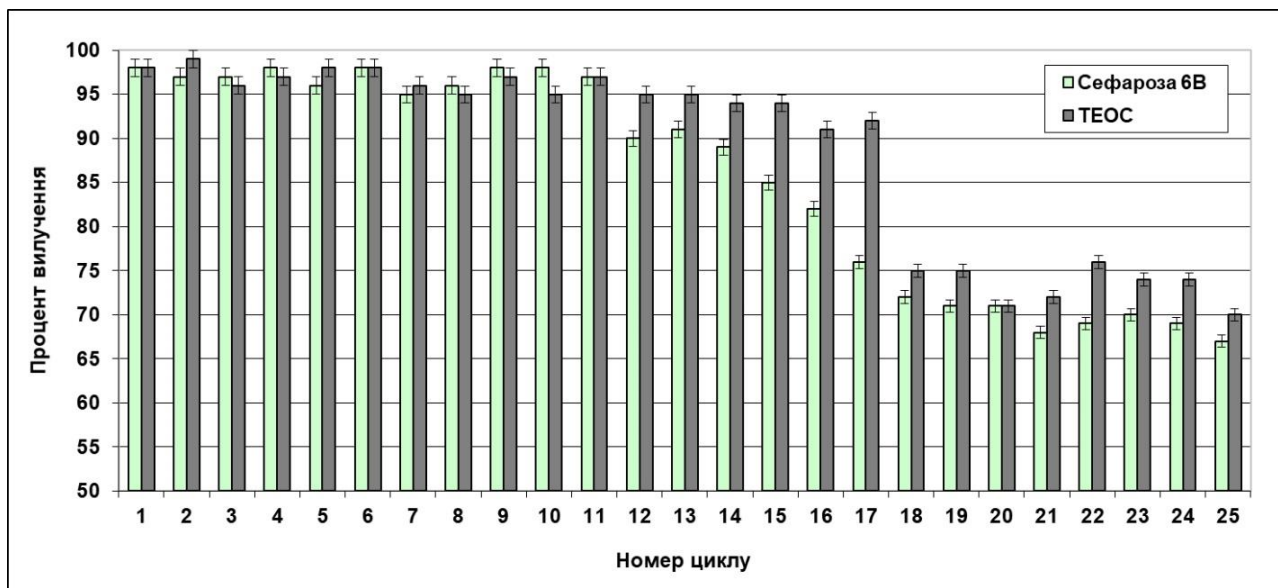


Рисунок 3.14 – Залежність ступеня вилучення рІЛ-7 при багаторазовому використанні колонки

Зазначимо, що отримані нами сорбенти можуть бути використані як для наукових досліджень, так і на практиці (у виробничому процесі). Відповідно, діапазон концентрацій цільової речовини у розчинах, звідки передбачається вилучення ІЛ-7 людини, може бути доволі широким. Виходячи із даних передумов, на нашу думку, доцільним було вивчити залежність ступеня вилучення рІЛ-7 від його концентрації у розчині. Отримані результати (табл. 3.10) свідчать про можливість доволі ефективного вилучення рІЛ-7 навіть із достатньо розведених розчинів для обох синтезованих колонок.

Таблиця 3.10 – Залежність ступеня вилучення рІЛ-7 від його концентрації у розчині

Об'єм розчину, мл	Концентрація рІЛ-7 у розчині, мкг/мл	Ступінь вилучення, %	
		Сефароза 6В	ТЕОС
500	0,005	79	80
50	0,05	96	96
10	0,5	97	97
1	5	97	98
1	20	98	97

Оцінку можливості вимивання іммобілізованих мАт із синтезованих ІАК проводили за допомогою методу адсорбційної УФ-спектроскопії (при довжині хвилі 280нм) при промиванні відповідних колонок (варіанти №№ 6 та 12, табл. 3.9) десятикратним об'ємом фосфатного буферного розчину (рН 7,2) та етилового спирту. Було отримано результати, що засвідчили відсутність вимивання мАт із колонок обох видів.

Таким чином, на даному етапі роботи було здійснено синтез та порівняльну характеристику імуноафінних колонок для специфічного вилучення рІЛ-7 – на основі сефарози 6В та тетраетоксисилану. Характер іммобілізації моноклональних антитіл на дані сорбенти є рівнозначним з технологічної точки зору. Було доведено, що ІАК на основі ТЕОС та анти-ІЛ-7 мАт 325D2, характеризується більшою ефективністю вилучення рІЛ-7. Найкращим елюентом виявився розчин 4М хлориду магнію. Синтезовані нами імунохроматографічні колонки на основі сефарози 6В та ТЕОС характеризуються високими значеннями ступеню вилучення (не менше 96%) у широкому діапазоні концентрацій рІЛ-7 ( $5 \times 10^{-3}$ - $2 \times 10^1$  мкг/мл), проте ІАК на основі сефарози 6В є дещо менш стабільною при багаторазовому використанні (більше 12 циклів).

Чистоту отриманого із використанням трьох видів хроматографічної очистки був охарактеризований щодо вмісту баластних білків та домішок за допомогою електрофорезу у ПААГ у редуруючих умовах (рис. 3.15), а його біологічна активність була оцінена у МТТ-тесті на моноклеарних клітинах периферичної крові. Біологічна активність оцінювалася у порівнянні із

стандартним (калібрувальним) зразком рІЛ-7 виробництва “ReproTech”, США, що дозволило розрахувати вміст досліджуваного цитокіну у зразку препарату [92]. Чистота отриманого препарату склала близько 98%.

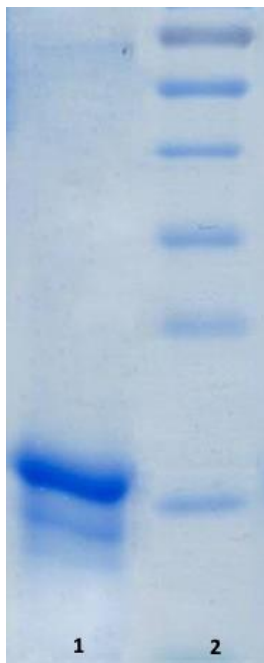


Рисунок 3.15 – Електрофореграма препарату рІЛ-7:

1 – препарат рІЛ-7; 2 – маркери ММ (130, 100, 70, 55, 25, 15 кДа)

### Висновки до розділу 3

На даному етапі роботи було оптимізовано кількісний склад живильного середовища для культивування рекомбінантного штаму *E. coli* – продуцента рІЛ-7. Було встановлене раціональне кількісне співвідношення між органічними компонентами та мінеральними речовинами, які входять до складу живильного середовища. Найбільш прийнятним на даному етапі, виявилася методика дробового факторного експерименту, що дозволило скоротити кількість дослідів до мінімуму, при наявності багатьох змінних факторів, що впливають на кінцевий результат. Розділивши всі досліді на дві стадії та послідовно оптимізувавши співвідношення органічних компонентів та мінеральних речовин в середовищі,

нам вдалося підвищити вихід біомаси в 1,4 рази, а синтез рІЛ-7 – в 1,3 рази, у порівнянні з базовим складом.

На наступному етапі оптимізували якісний склад живильного середовища, досліджуючи вплив різноманітних добавок до нього, таких як рослинні екстракти та вітамін К<sub>1</sub> в звичайній та ліпосомальній формах. Було доведено стимулюючу дію екстрактів клівії кіноварної і зефірантесу великоквіткового в діапазоні 0,5-1,0% від загальної кількості ЖС, а також ліпосомальної форми вітаміну К<sub>1</sub> у кількості 15-25мг/мл в якості добавок до живильного середовища при культивуванні рекомбінантного продуцента *E. coli*. Було показано, що при додаванні фітоекстрактів підвищується вихід біомаси в 1,69-1,82 рази та рІЛ-7 в – 1,69-1,82 рази, а при додаванні вітаміну К<sub>1</sub> вихід біомаси зростає в 1,56 рази та рІЛ-7 в – 1,69-1,82 рази. Варто зазначити, що збільшення концентрації фітоекстрактів до 5,0% призводило до пригнічення росту і біосинтетичної активності бактеріального продуценту.

Проаналізувавши механізм взаємодії біологічно активних речовини досліджених екстрактів встановили, що вони взаємодіють з поверхневими структурами бактеріальної клітини, а саме поринами і порино-подібними білками: OmpC і OmpF (екстракт клівії кіноварної), OmpA, OmpC і OmpF (екстракт зефірантесу великоквіткового). Такі речовини як вуглеводи і мінеральні солі, що містяться в екстрактах рослин, не мають істотний вплив на рівень експресії різних поринів і порино-подібних білків кишковою паличкою. Механізм цієї взаємодії з великою часткою ймовірності пов'язаний з конкуренцією речовин рослинного походження за зв'язування з клітинними рецепторами на поверхні бактеріальної клітини.

Розроблено високоспецифічний метод очистки рІЛ-7 на основі імуноафінної хроматографії. Було досліджено різні основи для імуноафінної колонки, елементи зв'язування рІЛ-7 на основі моноклонарних антитіл та розчинів для елюції. Проаналізовано ефективність стабільності наповнювачів, при проведенні багатостадійної очистки. Низка проведених дослідів дозволила встановити, що найкращі результати очистки отримано при використанні

зв'язуючого агенту МАт 325D2, тетраетоксисилану, в якості наповнювача та 4 М розчину  $MgCl_2$  для елюції. Також, проведені досліді дозволили встановити, що тетратоксисилан, в якості наповнювача колонки, можна використовувати до 15 послідовних циклів, без втрати якості кінцевого продукту. В результаті ми отримати субстанцію рІЛ-7 із чистотою 98%.

**Результати, отримані у даному розділі, опубліковані у таких працях:**

1. Galkin OYu, Lutsenko TM, Gorshunov YuV., **Motronenko VV**. Development of the method for microbiological purity testing of recombinant human interleukin-7-based product. Ukrainian Biochemical Journal. 2017;89(3):52-59. (SCOPUS)
2. **Motronenko V**, Lutsenko T, Galkin A, Gorshunov Y, Solovjova V. Optimization of the culture medium composition to increase the biosynthesis of recombinant human interleukin-7 in *Escherichia coli*. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2020;9(4):761-768. (SCOPUS)
3. **Мотроненко ВВ**. Склад живильного середовища для культивування бактеріального продуценту рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини. Матеріали XIII Всеукраїнської науково-практичної конференції (для студентів, аспірантів і молодих учених) "Біотехнологія XXI століття"; 2019 квіт. 19; Київ. Київ 2019, с 53.
4. **Motronenko VV**. Analysis of the effects of hydrodynamic conditions in submerged culturing of recombinant bacteria. Матеріали XXVI Міжнародної науково-практичної конференції молодих учених та студентів "Topical issues of new medicines development". 2019 квіт. 10-12; Харк. Харків НФаУ 2019, с. 176-178.
5. **Motronenko V**. Improvement of biotechnology for the production of recombinant interleukin-7. Матеріали 85 Ювілейної Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів "Наукові здобутки

- молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті", присвяченої 135-річчю Національного університету харчових технологій. 2019 квіт. 11-12; Київ. К.: НУХТ 2019, с. 523.
6. **Мотроненко ВВ.** Оптимізація складу живильного середовища для біосинтезу рекомбінантних білків у бактеріальних системах експресії. Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції-школи студентів та молодих учених "BIOMED Talks-2019". 2019 жовт. 15-17; Київ. Київ 2019, с. 88-89.
  7. **Мотроненко ВВ,** Луценко ТМ. Оптимізація біотехнології отримання рекомбінантного інтерлейкіну-7 та його використання для лікування ранових інфекцій. VIII Міжнародна науково-практична онлайн конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії». 2019 лист. 15; Київ. Київ 2019, с.60-61.
  8. **Motronenko V,** Lutsenko T, Rybalko S, Starosyla D, Hryhoreva S, Galkin O. Obtaining of recombinant human interleukin-7 and their use for the treatment of wound infections. Conference materials of the young scientists conference "Youth and modern problems of microbiology and virology". 2019 novem. 12-14; Kyiv. Kyiv 2019, p. 26.



#### 4 ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРЛЕЙКІНУ-7 ЛЮДИНИ НА ПЕРЕБІГ РАНОВОЇ ІНФЕКЦІЇ

За останні десятиліття сформувалася чітка тенденція до значного збільшення питомої ваги інфекційних хвороб, викликаних штамами синегнійної палички та золотистого стафілокока, зокрема на тлі інших відомих збудників гнійно-септичних ускладнень в опікових та хірургічних клініках [134, 135]. Це обумовлено, в першу чергу, внутрішньолікарняним інфікуванням цими мікроорганізмами, оскільки частота їх виділення зростає пропорційно тривалості знаходження хворого в стаціонарі. Як правило, синегнійна інфекція розвивається у хворих зі зниженою природною резистентністю (при опіках, онкологічних захворюваннях, при використанні імунодепресантів тощо). Збудники характеризуються резистентністю до багатьох антимікробних препаратів, що обумовлює високу смертність від розвинутого сепсису [136-138]. Резистентність *Pseudomonas aeruginosa* до дезінфікуючих агентів перешкоджають їх елімінації з об'єктів внутрішнього середовища клінік [139, 140]. Все це безумовно свідчить про актуальність проблеми пошуку шляхів, що спрямовані на боротьбу з синегнійною інфекцією. Дана проблема набуває ще більшої актуальності для військово-польової хірургії [141, 142]. Для України як для регіону, у якому ведуться бойові дії, характерне збільшення чисельності контингентів хворих, що піддаються різним хірургічним втручанням та маніпуляціям, використання нових інвазійних методів діагностики та лікування. Все це обумовлює збільшення внутрішньолікарняних інфекцій, викликаних патогенними та умовно-патогенними мікроорганізмами. Слід зазначити, що при синегнійній інфекції важливого значення набувають фактори, що впливають на стан імунної системи макроорганізму [17].

З огляду на наведене вище вивчення впливу препарату рІЛ-7 як супутньої терапії при ранових інфекціях, зокрема обумовлених *P. aeruginosa*, є перспективним та актуальним науковим завданням. Слід зазначити, що проведений нами аналіз наукових робіт останніх років не виявив робіт із

дослідження впливу препаратів ІЛ-7 на перебіг ранових інфекцій, чим, власне, й обумовлюється новаторський підхід, запропонований у нашій роботі. Метою роботи було оцінити ефективність використання препарату рІЛ-7 людини при рановій інфекції *P. aeruginosa* в експерименті у мишей.

Для проведення експерименту використовували 20 мишей, яким моделювали клініку ранової інфекції, відповідно до методики описаної в підрозділі 2.2.6. При цьому, у всіх дослідних тварин спостерігали однакові клінічні ознаки ранової інфекції. Було зафіксовано такі клінічні прояви розвитку синегнійної інфекції, як гіперемія тканин навколо рани, обмежений набряк, достатнє розходження країв рани, гнійні виділення з розрізу. Моніторинг проявів ранової інфекції та розмірів рани впродовж перебігу експерименту проводиться методом візуального спостереження, а підтвердження ходу дослідження здійснювали фотодокументуванням.

На другу добу у всіх тварин були взяті посіви – відокремлюване з ран з метою виділення збудника інфекції та з'ясування його кількості. Для отримання кількісних результатів використовували метод серійних розведень. На 3-тю добу від початку нанесення рани і зараження кількість мікробних клітин *P. aeruginosa* в перерахунку на  $1\text{см}^2$  відокремлюваного з рани матеріалу коливалося в діапазоні від  $1,0 \times 10^3$  до  $1,0 \times 10^6$  клітин/ $\text{см}^2$ .

На 2-гу добу було сформовано дві експериментальних групи тварин: дослідну та контрольну, по 10 мишей в кожній. Кожна тварина знаходилася в окремій клітці. Кожній дослідній миші починаючи з 3-ї доби від початку експерименту та кожної доби до загоєння рани (елімінації збудника) протягом 7-и діб внутрішньочеревно вводили 5мкг (0,1мл) препарату рІЛ-7. Таким чином, кожна тварина в дослідній групі одержувала 35мкг рІЛ-7. В контрольній групі тварин препарат рІЛ-7 не вводили.

На 5-ту добу від початку експерименту (на 3-тю добу від початку введення препарату рІЛ-7) знову було взято посіви з ран для визначення якісного та кількісного знаходження збудника *P. aeruginosa* в матеріалі, відокремленому з рани. Згідно Наказу МОЗ України №236 від 04.04.2012р. «Про організацію

контролю та профілактики післяопераційних гнійно-запальних інфекцій, спричинених мікроорганізмами, резистентними до дії антимікробних препаратів» факт виділення мікроорганізму з рани є свідченням його етіологічного значення в інфекційному гнійно-запальному процесі [113].

Отримані дані свідчать, що на 5-ту добу від початку експерименту у мишей дослідної групи, що отримували рІЛ-7 внутрішньочеревно, кількість мікробних клітин *P. aeruginosa* в перерахунку на  $1\text{см}^2$  коливалася від  $1,0 \times 10^4$  клітин/ $\text{см}^2$  (найменше значення) до  $5,0 \times 10^5$  клітин/ $\text{см}^2$  (найбільше значення). У мишей контрольної групи, що не отримували лікування препаратом цитокіну, кількість мікробних клітин *P. aeruginosa* в перерахунку на  $1\text{см}^2$  відокремлюваного з рани коливалася від  $3,0 \times 10^3$  клітин/ $\text{см}^2$  (найменше значення) до  $1,0 \times 10^6$  клітин/ $\text{см}^2$  (найбільше значення), що є на один порядок більше в максимальному значенні, ніж у мишей дослідної групи.

Зовнішні прояви ранової інфекції у мишей обох груп на п'яту добу від нанесення рани зараження *P. aeruginosa* були такі ж самі, як і на третю добу, але більш яскраво виражені.

На сьому добу від початку досліді у мишей, що отримували лікування препаратом рІЛ-7, відмічено добре виражену тенденцію до загоєння рани (підсихання, утворення кірочок). Було взято посіви на наявність збудника синегнійної інфекції, які показали, що у мишей з дослідної групи (ті, що отримували лікування) *P. aeruginosa* з поверхні рани повністю зникла.

У контрольної групи мишей на сьому добу навпаки: у 2-ох дослідної тварини *P. aeruginosa* з рани не виділена, у інших мишей кількість мікробних клітин *P. aeruginosa* в перерахунку на  $1\text{см}^2$  коливалася від  $1,0 \times 10^3$  клітин/ $\text{см}^2$  до  $1,0 \times 10^5$  клітин/ $\text{см}^2$ . Ознаки інфікування рани у контрольних тварин досі присутні: є гіперемія, утворення струпів, хоча тенденція до загоєння теж є.

На 9-ту добу у мишей, що отримували лікування рІЛ-7, при зовнішньому добре відзначеному загоєнні рани, відбулася повна елімінація збудника *P. aeruginosa*, про це свідчать посіви з ран, взяті на 9 добу.

На 9-ту добу у 6-ти мишей з контрольної групи спостерігалася тенденція до загоювання та елімінації збудника. У 4-ох мишей з цієї групи зберігаються ознаки інфікування рани, що підтверджується мікробіологічними посівами, де кількість збудника *P. aeruginosa* зберігається на достатньо високому рівні – в кількості  $1,0 \times 10^5$  клітин в  $1 \text{ см}^2$ .

На 12-ту добу у дослідної групи мишей відзначається практично повне загоєння рани аж до початку відновлення шерстяного покриву. *P. aeruginosa* з ран не виділяється.

У 6-ти мишей з контрольної групи на 12-ту добу експерименту збудника в посівах з ран не виділено, відбувається загоєння рани. У 4-ох мишей зберігаються ознаки інфікування рани. Збудник *P. aeruginosa* в  $1 \text{ см}^2$  виділяється в значно меншій кількості  $3,0 \times 10^3$ ;  $5,0 \times 10^3$  мікробних клітин.

Повна елімінація збудника з поверхні рани у мишей контрольної групи відбулася на 14-ту добу від початку нанесення рани й інфікування синегнійною інфекцією. Стан повного загоєння ран теж припадає на цей день. Динаміка ранової інфекції *P. aeruginosa* в експерименті та дослідів представлена на рисунку 4.1. Динаміка елімінації збудника представлена рисунку 4.2.

Більшість дослідників відносять *P. aeruginosa* до умовних патогенів, здатних проявляти свої інвазивні і токсигенні властивості при екстремальних ситуаціях [136-140]. Частота гнійно-запальних ускладнень синегнійної етіології може бути спровокована й тим, що цей збудник в умовах стаціонару вельми невибагливий до поживних речовин, тривало зберігається у довкіллі, високо стійкий до антибіотиків і антисептиків та продукує велику кількість різноманітних позаклітинних токсичних субстанцій, що здатні пригнічувати природну резистентність макроорганізму [144]. Цими субстанціями (факторами патогенності) можуть бути: поверхневі компоненти клітин (полісахарид слизу, мукоїдний полісахарид, О-антиген ЛПС, ліпід А), які є токсичними для нейтрофілів та мають ендотоксиподібні властивості. Полісахарид слизу *P. aeruginosa* має антифагоцитарний ефект та пригнічує місцевий легеневий імунітет – здатність до виведення синегнійної палички легень. До факторів

патогенності також відносяться позаклітинні продукти: протеази, екзотоксин А, фосфоліпаза С – лецитиназа, які пригнічують комплемент залежні механізми захисту та токсичні для макрофагів [144]. Таким чином, стан імунної системи має важливе, а іноді вирішальне, значення для прогнозу перебігу ранової інфекції, викликаной *P. aeruginosa*.

День від початку  
експерименту

Дослідна група

Контрольна група

1 день



7 день



12 день

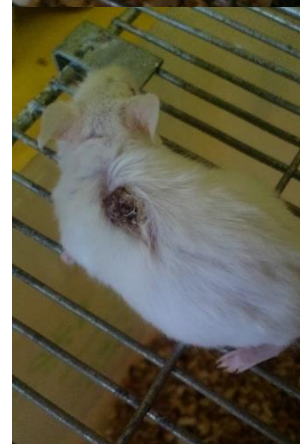


Рисунок 4.1 – Динаміка перебігання ранової інфекції *P. aeruginosa* в тварин контрольної та дослідної груп

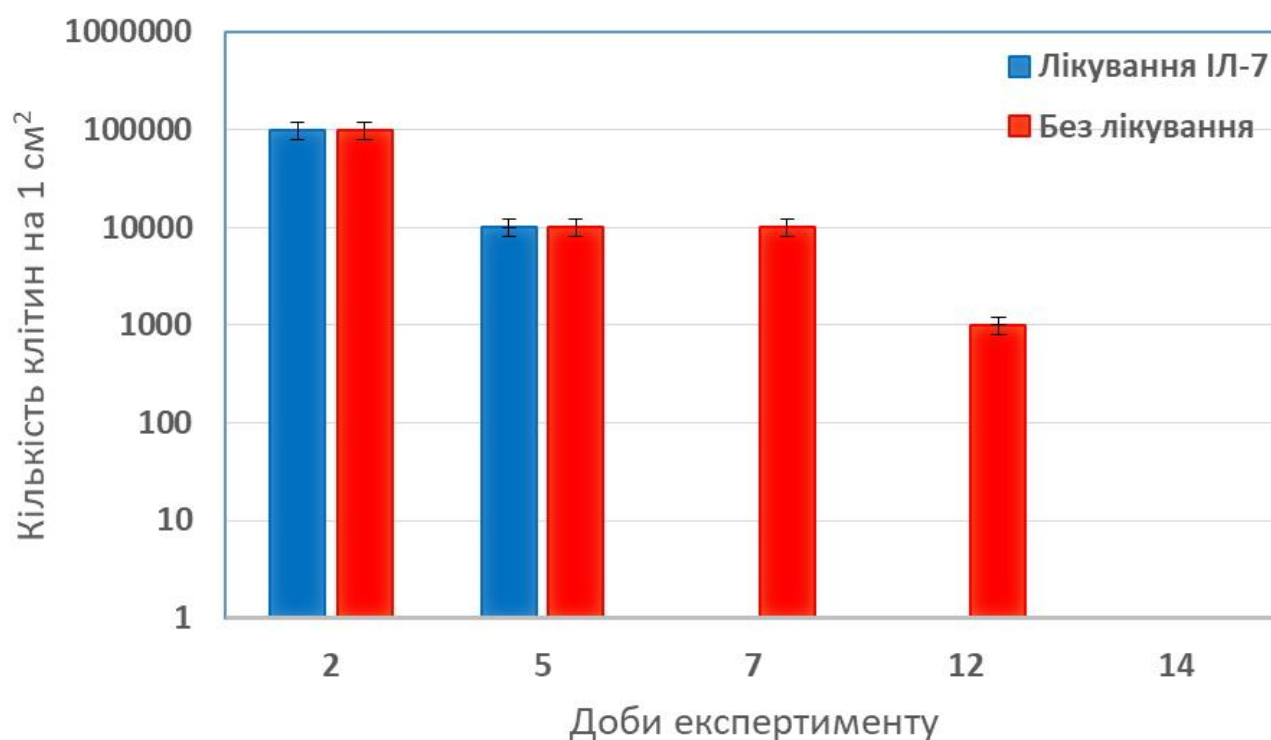


Рисунок 4.2 – Динаміка елімінації збудника *P. aeruginosa* з ран дослідних тварин

У літературі описано декілька прикладів застосування препаратів цитокінів, зокрема інтерлейкіну-2 та інтерферону-альфа 2b, у комплексній терапії ранових інфекцій. Так, наприклад, введення препарату ІЛ-2 зумовлювало збільшення кількості лімфоцитів та макрофагів у рані, прискорюючи зміни стадій перебігу ранового процесу, підвищенню активності фагоцитуючих клітин у рановому вогнищі, що сприяло швидшому загоєнню ран [145, 146].

Досліджуваний нами цитокін – ІЛ-7 являє собою перший тип коротколанцюгових цитокінів родини гематопоетинів [147, 148]. Відомо, що основними місцями утворення ІЛ-7 в людському організмі є негемопоетичні клітини стромы кісткового мозку, тимус, а також лімфоїдні органи. Однією з перших біологічних властивостей ІЛ-7 була виявлена його здатність активувати попередників В-клітин, а також незрілі і зрілі Т-клітини [149, 150]. На сьогоднішній день, доведено ключову роль ІЛ-7 у Т- і В- лімфопоезі [151]. Серед важливих ефектів даного цитокіну слід відзначити його роль як модулятора низькоафінної пептид-індукованої Т-клітинної проліферації. Цю властивість розглядають як важливий механізм гомеостатичної регуляції Т-клітинних

популяцій. На користь даного механізму свідчать дані про зростання рівня ІЛ-7 в плазмі та лімфі у відповідь на виснаження пулу Т-лімфоцитів [151]. Серед іншого доведено участь ІЛ-7 у процесах розвитку дендритних клітин, натуральних кілерів й клітин-індукторів лімфоїдної тканини [152]. Таким чином, отримані нами результати добре узгоджуються із наявними літературними даними, як щодо патогенезу синегнійної інфекції, так й щодо імуномодуючих властивостей ІЛ-7. Одержані результати, на нашу думку, є важливою передумовою для розробки протоколів комплексного лікування ранових інфекцій, особливо у пацієнтів із скомпрометованою імунною системою, так само як і готових лікарських форм на основі рІЛ-7.

#### **Висновки до розділу 4**

Було показано ефективність застосування рІЛ-7 при лікуванні ранових інфекцій в експерименті *in vivo* на мишах. Було встановлено, що у 80% дослідних тварин, яким вводили внутрішньочеревно рІЛ-7, загоєння ран і елімінація збудника гнійно-запальної інфекції *P. aeruginosa* відбувається на 7-му добу. На 9-ту добу від початку нанесення рани і зараження збудником синегнійної інфекції відбувається загоєння ран і елімінація збудника гнійно-запальної інфекції *P. aeruginosa* у всіх дослідних мишей. У 60% мишей з контрольної групи, що не отримували лікування препаратом рІЛ-7, загоєння ран і елімінація збудника *P. aeruginosa* відбувається на 9-ту добу. Загоєння ран і елімінація збудника гнійно-запальної інфекції *P. aeruginosa* у всіх мишей контрольної групи відбувається на 14-ту добу. Тобто у мишей, що отримували лікування препаратом рІЛ-7, загоєння ран і елімінація збудника настає на 5-ть днів раніше, ніж у мишей з контрольної групи.

**Результати, отримані у даному розділі, опубліковані у таких працях:**

1. Grigorieva SM, Starosyla DB, Rybalko SL, **Motronenko VV**, Lutsenko TM,

Galkin OYu. Effect of recombinant human interleukin-7 on *Pseudomonas aeruginosa* wound infection. Ukrainian Biochemical Journal. 2019;91(5):9-17. (SCOPUS)

2. **Мотроненко ВВ**, Луценко ТМ. Оптимізація біотехнології отримання рекомбінантного інтерлейкіну-7 та його використання для лікування ранових інфекцій. VIII Міжнародна науково-практична онлайн конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії». 2019 лист. 15; Київ. Київ 2019, с.60-61.
3. **Motronenko V**, Lutsenko T, Rybalko S, Starosyla D, Hryhoreva S, Galkin O. Obtaining of recombinant human interleukin-7 and their use for the treatment of wound infections. Conference materials of the young scientists conference “Youth and modern problems of microbiology and virology”. 2019 novem. 12-14; Kyiv. Kyiv 2019, p. 26.



## **5 РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ СУБСТАНЦІЇ ІНТЕРЛЕЙКІНУ-7 ЛЮДИНИ ТА ЇЇ СТАНДАРТИЗАЦІЯ**

Субстанція рекомбінантного інтерлейкіну-7, технологія виробництва якої, представлена в даному розділі, в подальшому буде використовуватися для виробництва стерильних та нестерильних фармацевтичних препаратів, які можна використовувати при лікуванні онкологічних захворювань (солідних пухлин), гепатитів В та С, гнійних ранових інфекцій, та інших препаратів для підвищення імунітету людини.

Наведена технологія виробництва субстанції рІЛ-7 враховує результати досліджень наведених в попередньому розділі й дані щодо лабораторного методу отримання рІЛ-7 [92] та розрахована на виробництво субстанції рІЛ-7, вихід якої з одного літра культуральної рідини складає 1,2-1,25г/л, що відповідає 20-22% від загальної кількості білка продуцента, та має чистотою продукту на виході не менше 98%.

### **5.1 Технологія субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини**

Технологічний процес виробництва субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 відноситься до біотехнологічного виробництва, в основу якого покладена уніфікована схема проведення допоміжних процесів (підготовка обладнання, приміщень, персоналу, води, повітря тощо) та основних стадій виробництва. Проте, наявність рекомбінантного продуцента, вносить ряд особливостей до стандартних схем отримання, виділення та очистки продуктів мікробіологічного синтезу. Технологія виробництва рІЛ-7 представлена на технологічній та апаратурно-технологічній схемах (варто зазначити, що на апаратурно-технологічній схемі показані лише основні технологічні операції) (рис. 5.1 та 5.2), та складається з наступних стадій.

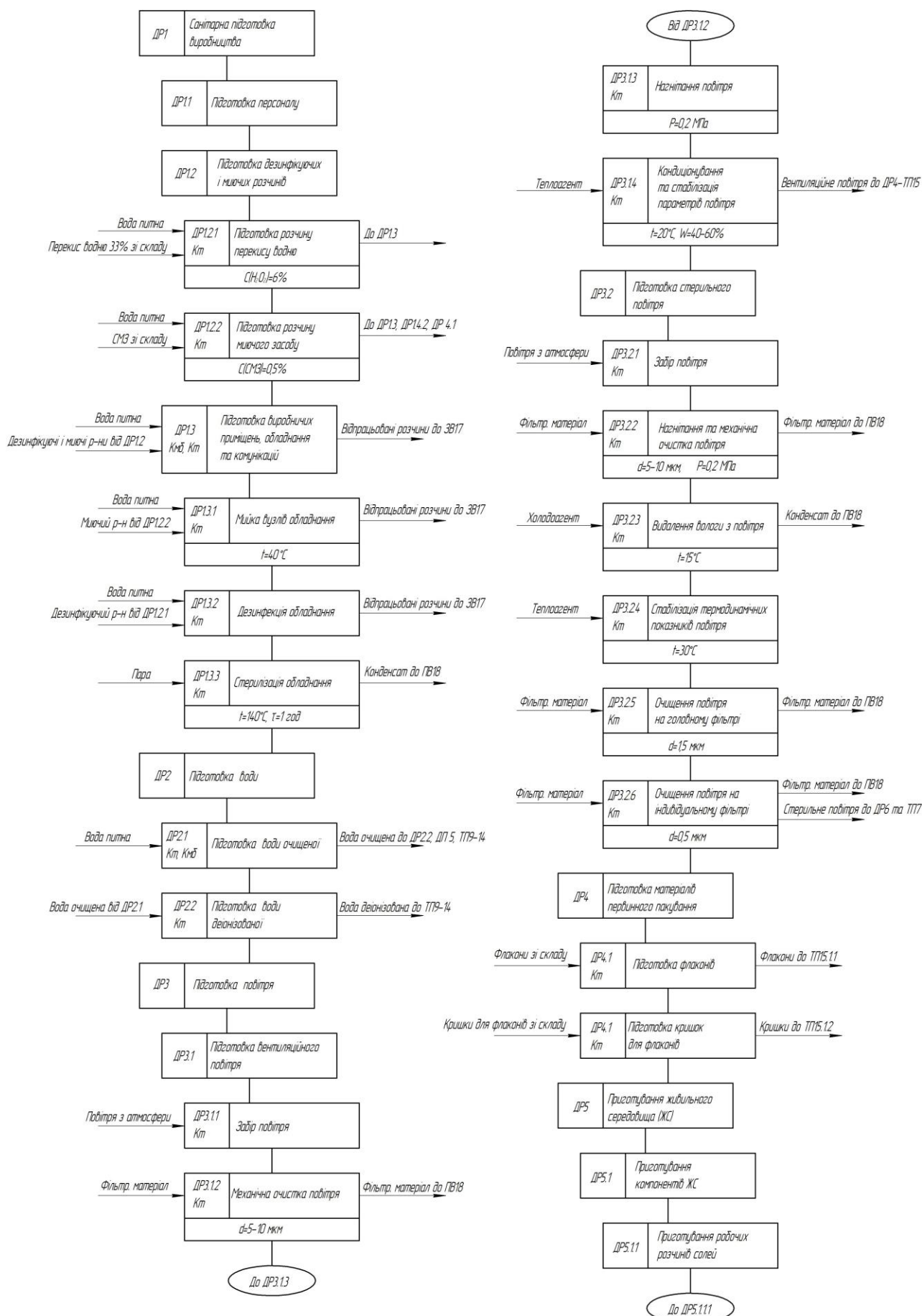


Рисунок 5.1, аркуш 1 – Технологічна схема виробництва субстанції pIL-7

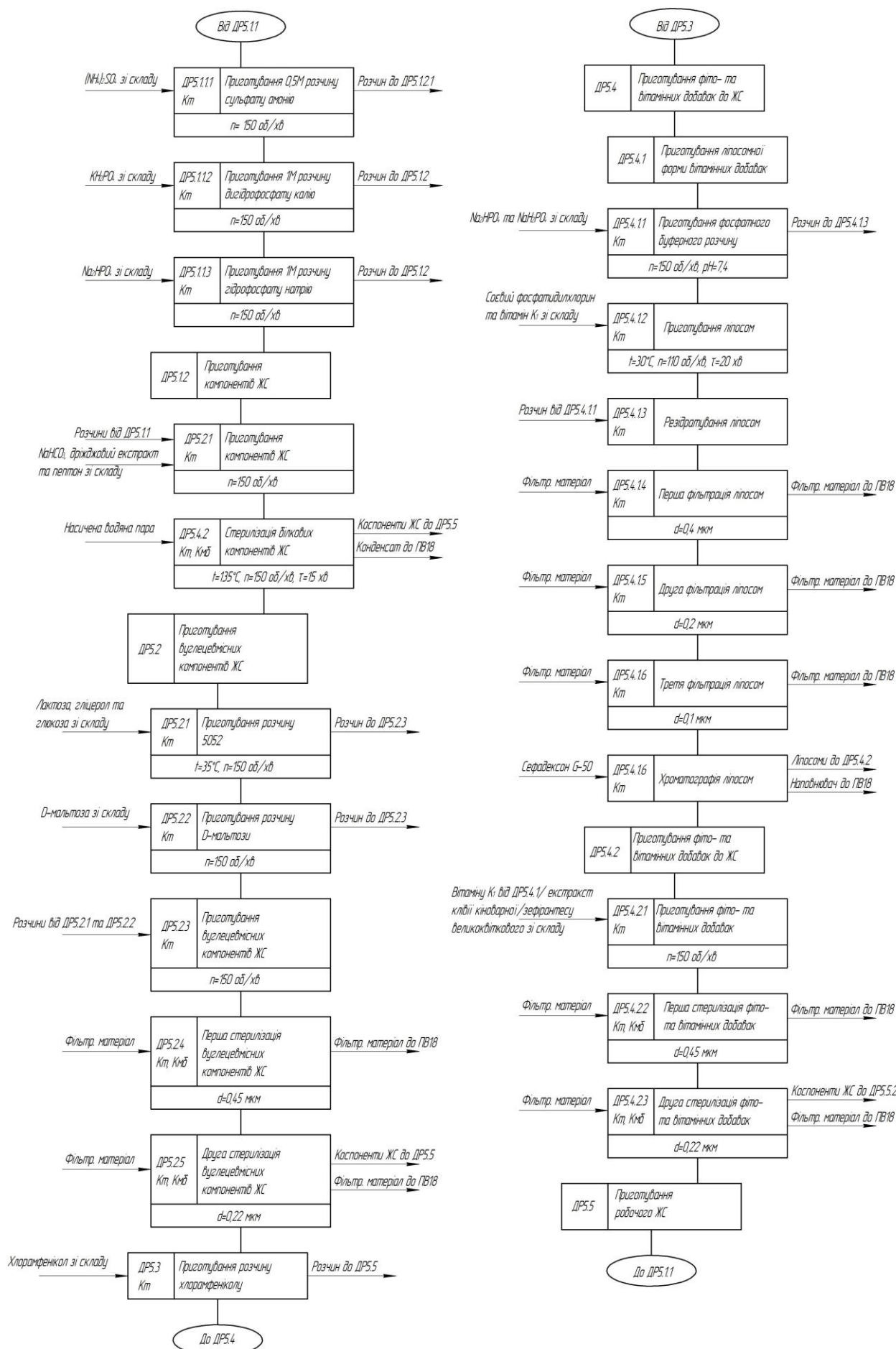


Рисунок 5.1, аркуш 2 – Технологічна схема виробництва субстанції рІЛ-7

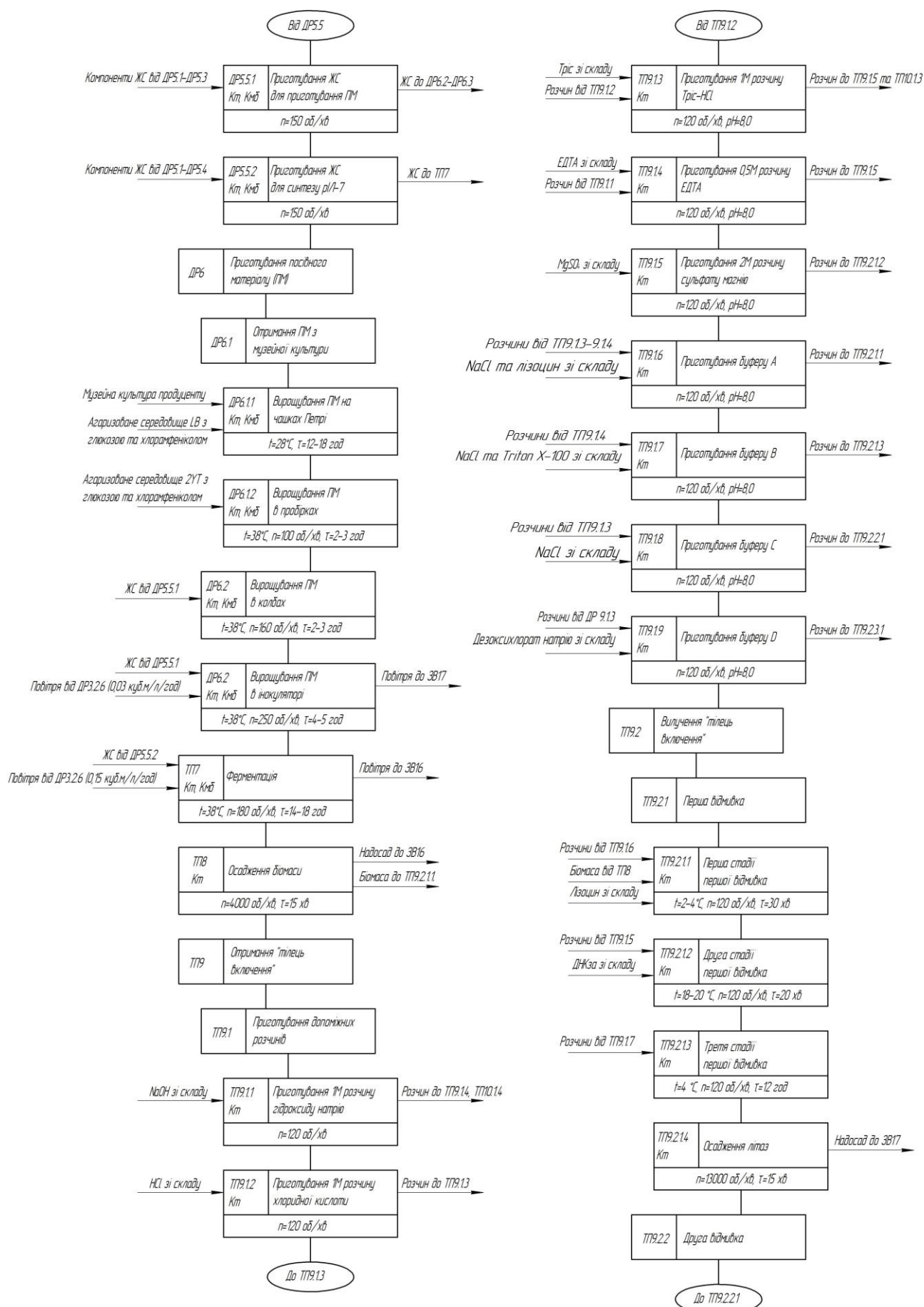


Рисунок 5.1, аркуш 3 – Технологічна схема виробництва субстанції pIL-7

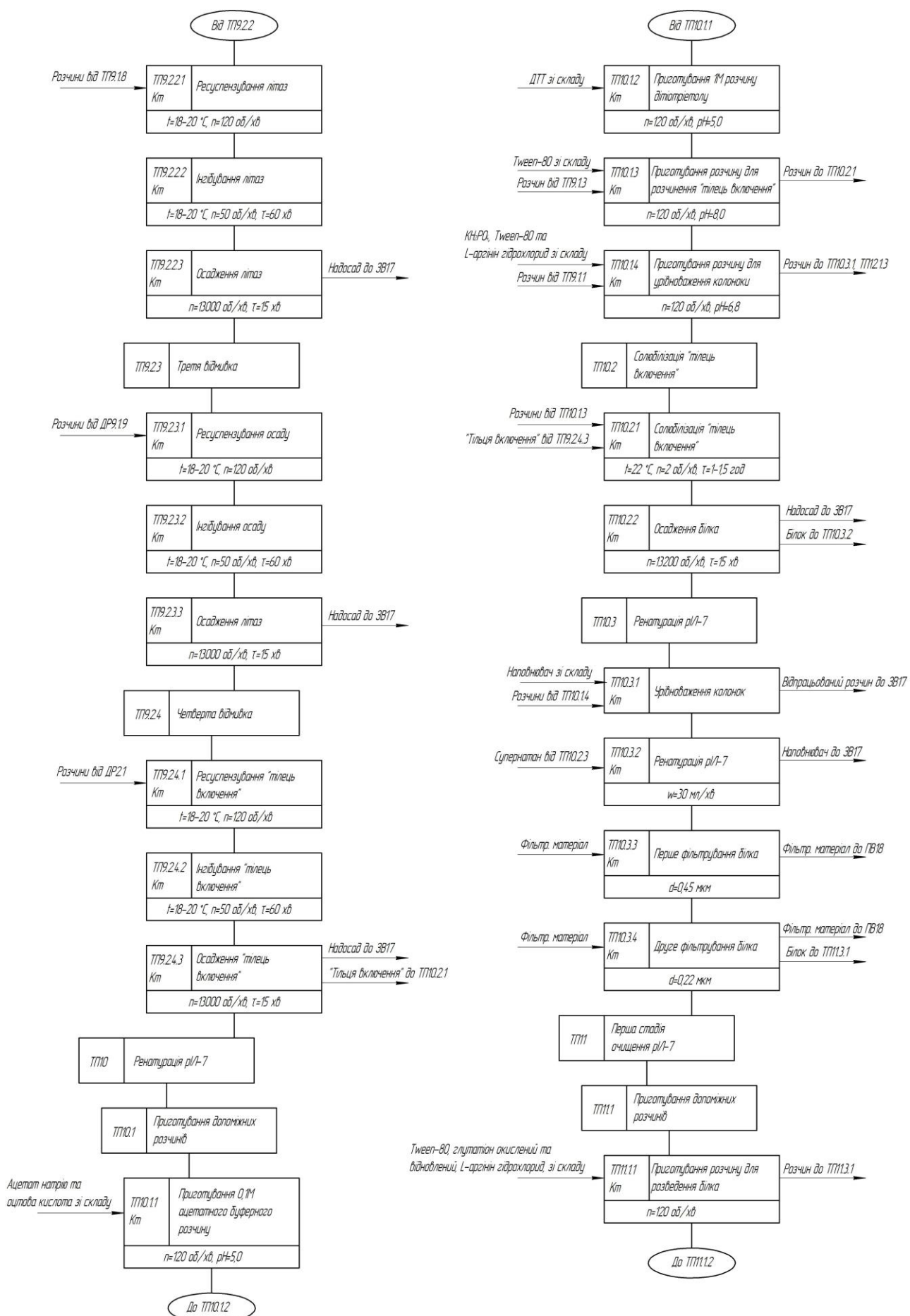


Рисунок 5.1, аркуш 4 – Технологічна схема виробництва субстанції рІІ-7



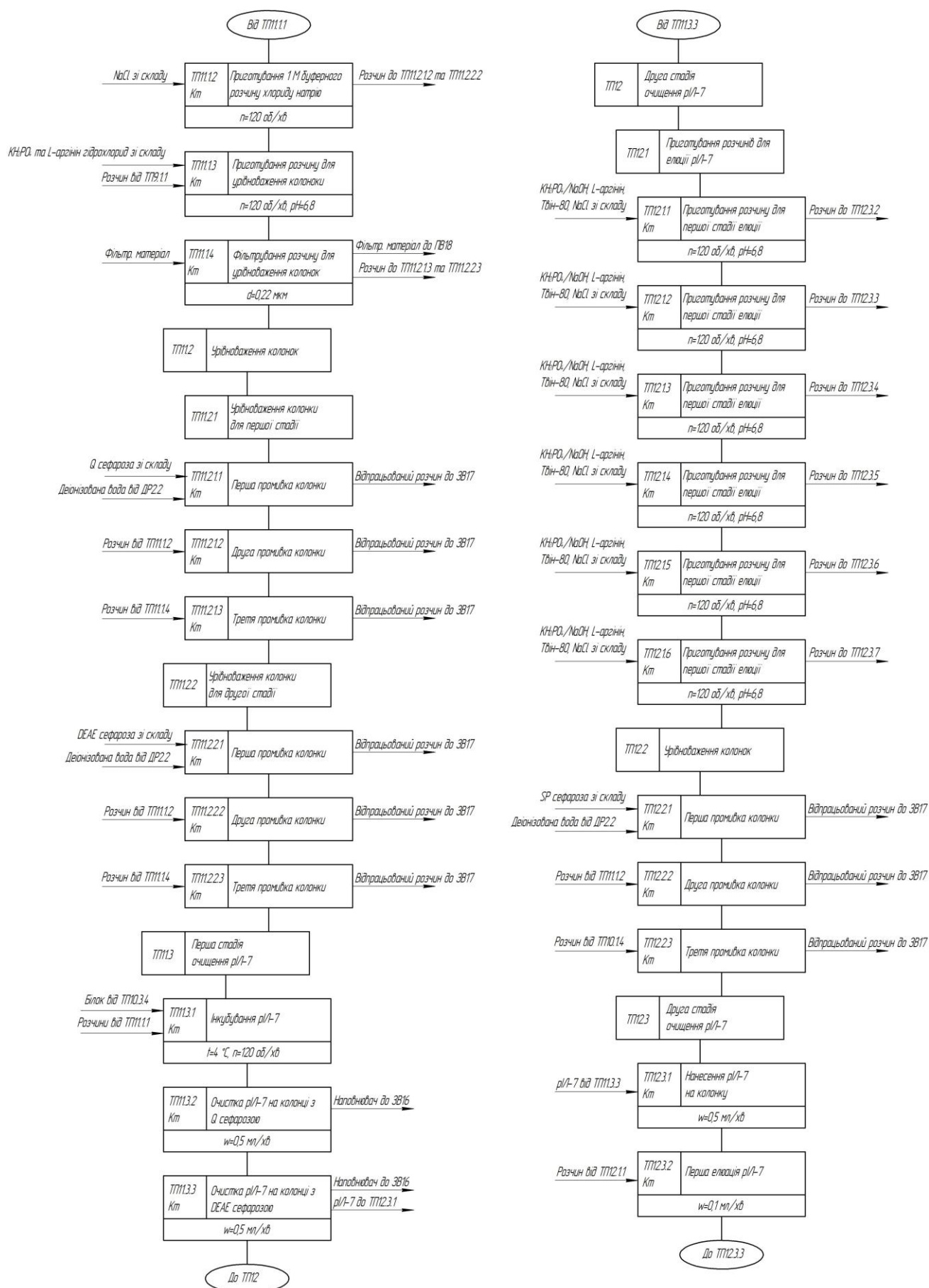


Рисунок 5.1, аркуш 5 – Технологічна схема виробництва субстанції рІЛ-7

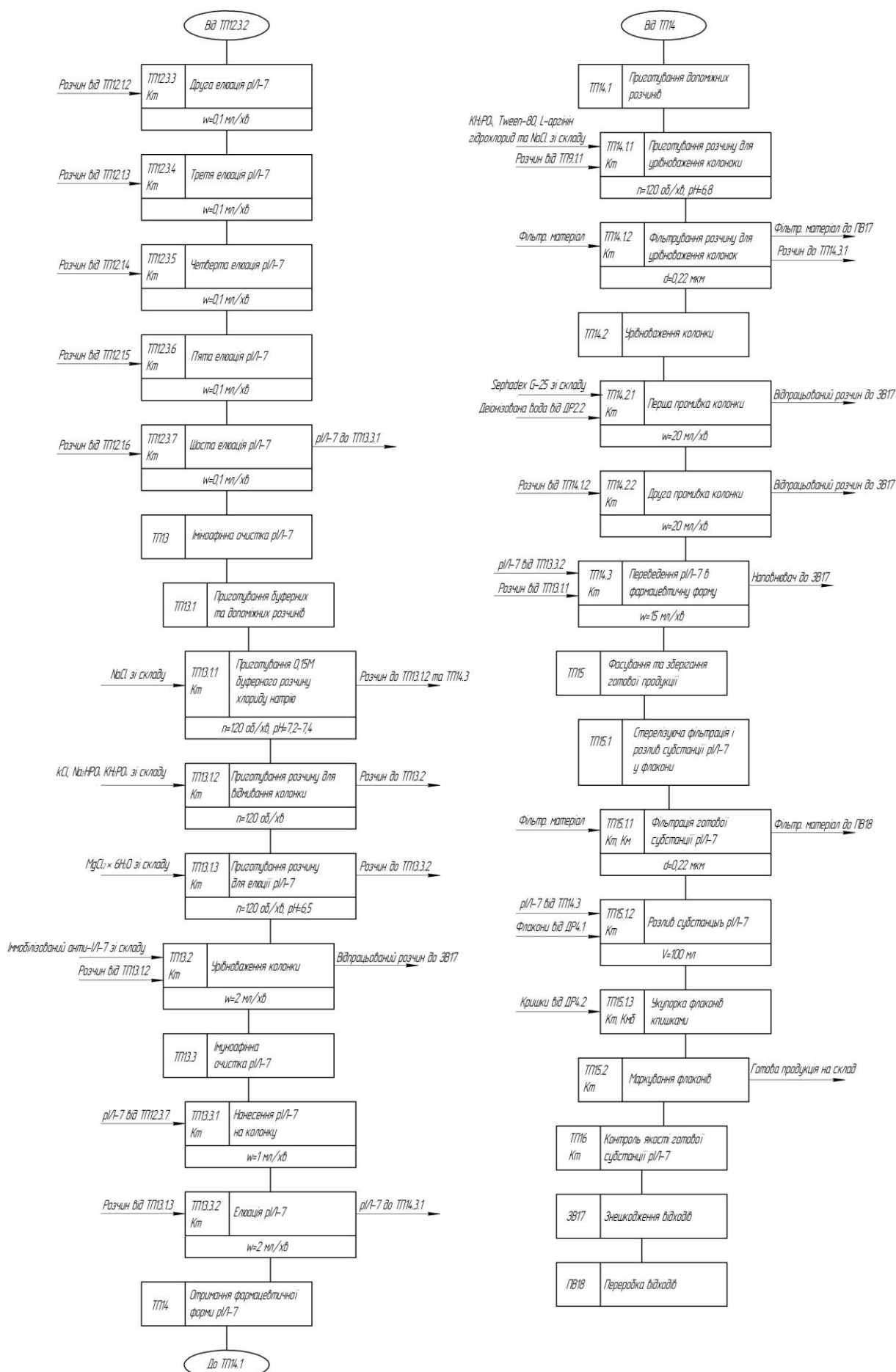


Рисунок 5.1, аркуш 6 – Технологічна схема виробництва субстанції рІІ-7

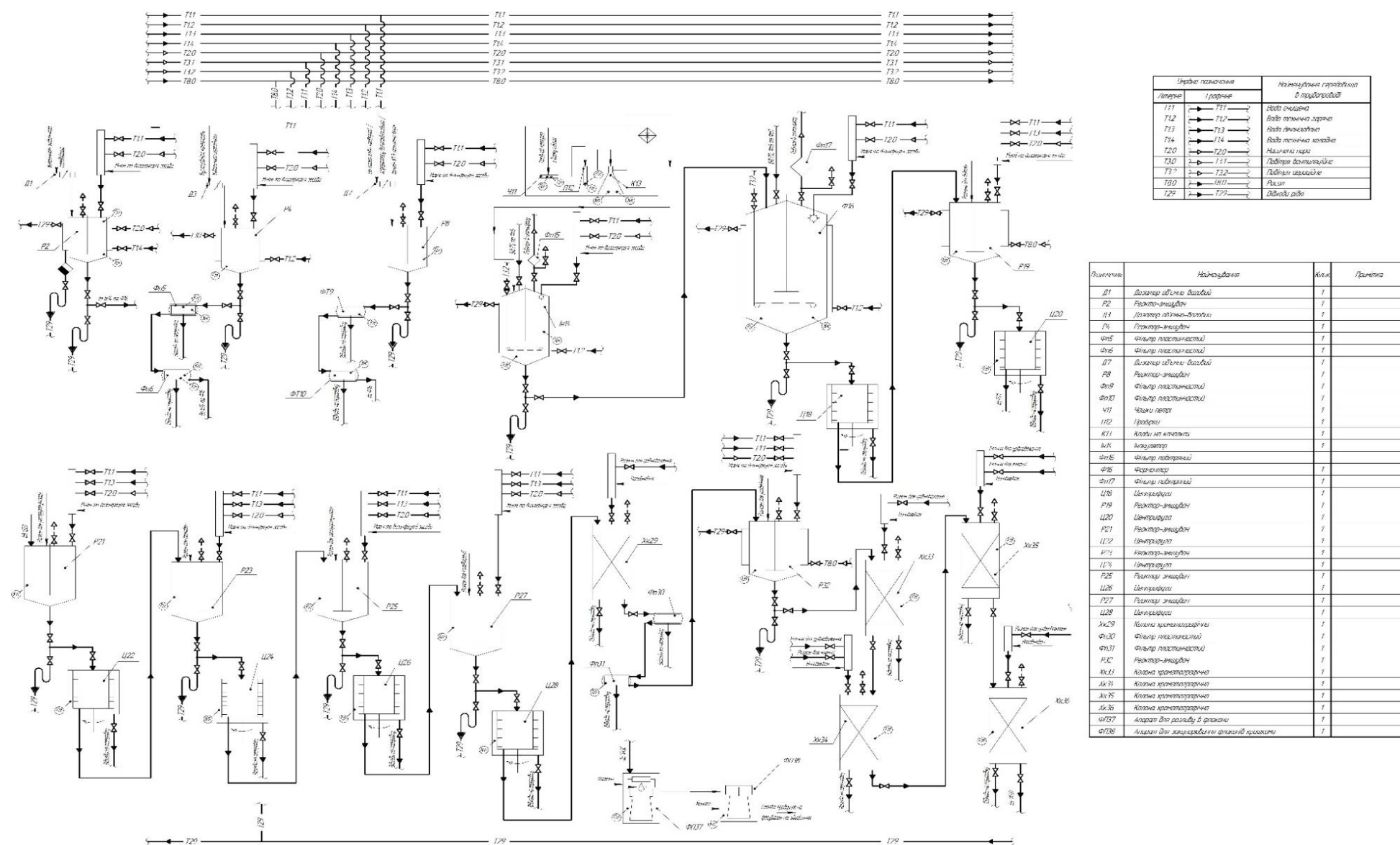


Рисунок 5.2 – Апаратурно-технологічна схема виробництва субстанції рІІ-7



## ДР 1. Санітарна підготовка виробництва.

На даній стадії, проводиться санітарна підготовка приміщень (обробка виробничих поверхонь, апаратів і комунікацій дезінфікуючими засобами, контроль відповідності приміщень класам чистоти); підготовка персоналу (медичні огляди та профілактичні заходи; інструктаж і перепідготовка; спецодяг); огляд, ремонт і підготовка обладнання (перевірка справності заземлення, герметичності апаратів і та ін.; відмивання, дезінфекція, стерилізація апаратів і трубопроводів).

### ДР 1.1. Підготовка персоналу.

Персонал переодягається в технологічний одяг та проводить санітарну обробку рук. Персонал, що проводить стерильні стадії технологічного процесу повинен попередньо переодягнутися в комплект стерильного технологічного одягу і обробку рук дезінфікуючим розчином.

### ДР 1.2. Підготовка дезінфікуючих і миючих розчинів.

Проводять приготування 0,5% розчину миючого засобу та 6% розчину перекису водню, які використовуються на подальших етапах підготовки виробництва, зокрема для підготовки обладнання, комунікацій та приміщень.

### ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень, обладнання та комунікацій.

Проводять очищення обладнання за допомогою 0,5% розчину миючого засобу та дезінфекцію 6% розчином перекису водню, після чого проводять п'ятикратну відмивку обладнання водою очищеною від залишків миючих і дезінфікуючих розчинів. Після чого проводять стерилізацію всього виробничого обладнання при наступному режимі:  $t=140^{\circ}\text{C}$ ,  $P=0,2\text{МПа}$ , тривалість процесу 1 год. Також, на даному етапі, проводять обробку робочих поверхонь, стін та підлоги 0,5% розчином миючого засобу.

## ДР 2. Підготовка води.

### ДР 2.1. Підготовка води очищеної

Підготовку води очищеної проводять за допомогою системи виробництва яка складається з система попередньої підготовки води та установки 2-х ступеневого зворотного осмосу. Очищену воду використовують для проведення

допоміжних та основних технологічних операцій. Вода очищена надходить на виробництво по трубопроводу Т 1.1.

#### ДР. 2.2. Підготовка води деіонізованої

Для проведення стадії очищення рІЛ-7 очищену на стадії ДР 2.1 воду пропускають через іонообмінну установку, що підвищує якість води і, як наслідок, якість кінцевого продукту. Вода деіонізована подається на виробництво по трубопроводу Т 1.3.

#### ДР 3. Підготовка повітря.

##### ДР 3.1 Підготовка вентиляційного повітря.

Підготовку вентиляційного повітря для виробничих приміщень проводять на припливній вентиляційній системі, що оснащена системою трьохступеневої очистки і кондиціонування повітря, яка складається з системи фільтрів, центрального кондиціонера і витяжної системи. Витяжна система оснащена фільтрами і аспіраційним вентилятором з м'якою вставкою. Параметри повітря для виробничих приміщень: температура  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  взимку і  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  влітку; відносна вологість не більше 60% з врахуванням технологічних вимог.

Підготоване вентиляційне повітря надходить до виробничих приміщень по трубопроводу Т 3.1.

##### ДР 3.2. Підготовка стерильного повітря.

Для отримання стерильного повітря, підготоване на попередній стадії, вентиляційне повітря проходить послідовну очистку на фільтрах тонкої очистки з діаметром пор 1,5мкм та 0,5мкм. Підготоване повітря подається до відповідних технологічних стадій через трубопровід Т 3.2.

#### ДР. 4. Підготовка матеріалів первинного пакування.

Для фасування готової субстанції рІЛ-7 використовують пластикові флакони, які герметично закриваються пластиковими кришками. Стерильні флакони та кришки надходять на склад запаковані в групову тару в вигляді палет з флаконами (кришками), покритих поліетиленовою плівкою та упакованих в гофрокартонний ящик. При отриманні зі складу, проводять обробку ящика 0,5% розчином миючого засобу, після чого розпаковують ящик з гофрокартону

дістають палети з флаконами (кришками) та проводять обробку поліетиленової упаковки 6% розчином перекису водню, після чого їх передають на технологічну стадію ТП 15.

ДР 5. Приготування живильного середовища.

ДР 5.1. Приготування компонентів живильного середовища.

ДР 5.1.1. Приготування робочих розчинів солей.

У необхідній кількості в окремих реакторах-змішувачах з перемішуючим пристроєм (швидкість обертання 150об/хв) готують робочі розчини солей: 0,5М розчин сульфату амонію  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1М розчин дигідрофосфату калію  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1М розчин гідрофосфату натрію  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .

ДР 5.1.2. Приготування компонентів живильного середовища

У реакторі-змішувачі Р2, оснащеному перемішуючим пристроєм та терморегулюючою сорочкою, змішують, з розрахунку на кожен літр середовища, 50мл 0,5М розчину  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 50мл 1М розчину  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 50мл 1М розчин  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 5г  $\text{NaHCO}_3$ , 17г пептону та 10г дріжджового екстракту. Вміст реактора доводять до 15л водою очищеною та перемішують при 150об/хв до повного розчинення компонентів. При ввімкненому перемішуючому пристрої нагрівають насиченою водяною парою до  $135^\circ\text{C}$  та витримують при цій температурі протягом 15хв. Стерильне поживне середовище охолоджують холодною водою до  $39^\circ\text{C}$  та подають трубопроводом на наступні стадії.

ДР 5.2. Приготування вуглецевмісних компонентів живильного середовища.

Розчин 5052 готують в реакторі-змішувачі Р4 з перемішуючим пристроєм (швидкість обертання – 150об/хв) та терморегулюючою сорочкою, при температурі  $35^\circ\text{C}$  до повного розчинення компонентів. Розчин 5052 складається з 10% лактози (100г/л), 25% гліцеролу (250мл/л) та 2,5% глюкози (25г/л).

В окремо готують 10% розчин D-мальтози (100г/л), який потім додають в реактор-змішувач Р4 до розчину 5052 (з розрахунку 20 мл розчину 5052 та 50мл/л 10%-го розчину D-мальтози на літр живильного середовища). Вміст реактора

доводять очищеною водою до 17л та перемішують при 150об/хв до повної гомогенізації розчину.

Готовий розчин стерилізують шляхом послідовної фільтрації через пластинчасті фільтри Фп5 та Фп6 з діаметром пор 0,45мкм і 0,22мкм. Стерильне живильне середовище подають трубопроводом на наступні стадії.

#### ДР 5.3. Приготування розчину хлорамфенікол.

На аналітичних вагах зважують 73,1мг хлорамфеніколу, поміщають в підготовлену стерильну пробірку та розчиняють в 2,1 мл 96% етилового спирту. Зберігають в морозильній камері при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$ . Готовий розчин антибіотику додають в ферментер до стерильного поживного середовища з розрахунку 0,173 мг хлорамфеніколу на один літр середовища.

#### ДР 5.4. Приготування фіто- та вітамінних добавок до живильного середовища

##### ДР 5.4.1 Приготування ліпосомальної форми вітамінних добавок.

Приготування ліпосом проводять гідратацією ліпідної плівки з подальшою екструзією. Спочатку готують фосфатно-буферним розчином (ФБР) з рН 7,4, на основі солей гідрофосфату та дигідрофосфату натрію ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$ ).

В органічний розчин ( $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}=2:1$ ), що містить СФХ, додають вітамін К<sub>1</sub> в концентраціях 125мг на 1мл розчину, а потім сушать в скляній колбі з круглим дном за допомогою роторного випарника в атмосфері азоту протягом приблизно 20хв при 110об/хв та температурі  $30^{\circ}\text{C}$ .

Далі отримані ліпідні плівки регідратують в присутності скляних кульок з фосфатно-буферним розчином з рН 7,4. Отриману суспензію п'ять разів пропускають через полікарбонатні мембрани зі зниженою порозністю (0,4, 0,2 і 0,1мкм) з використанням термобочкового екструдера. На закінчення, ліпосоми очищають за допомогою молекулярно-ексклюзійної хроматографії з сефадексом G-50 (Sigma, США) для видалення некапсульованого вітаміну К<sub>1</sub>. Підготовлену ліпосомальну форму вітамінних добавок використовують для подальшого додавання до живильного середовища.

ДР 5.4.2 Приготування фіто- та вітамінних добавок до живильного середовища

Для проведення основного біосинтезу, готують стимулюючі синтез ІЛ-7 добавки до поживного середовища, у нашому випадку це екстракти клівії кіноварної або зефірантесу великоквіткового, або ліпосомальної форми вітаміну К<sub>1</sub>.

Кожну з стимулюючих добавок готують в окремому реакторі-змішувачі оснащеному перемішувачим пристроєм та терморегулюючою сорочкою. Добавки розчиняють в воді у необхідній кількості, так щоб готове живильне середовища для виробничого біосинтезу містило або 0,5% від загального об'єму одного з фітоекстрактів, або 25мг/мл ліпосомальної форми вітаміну К<sub>1</sub>. Компоненти середовища розчиняють в воді очищених, при швидкості обертання перемішувача 150об/хв.

Отриманий розчин стерилізують шляхом послідовної фільтрації через пластинчастий фільтр з діаметром пор 0,45мкм і 0,22мкм. Стерильне поживне середовище подають трубопроводом на наступні стадії.

#### ДР 5.5. Підготовка робочого живильного середовища

Підготовлене живильне середовище на стадіях ДР 5.1 та ДР 5.2. змішують в інокуляторі Іп14 або робочому ферментері Ф16 та додають 173мл/л хлорамфеніколу підготовленого на стадії ДР 5.3. До складу середовища для проведення основного біосинтезу додають одну із стимулюючих добавок підготовлених на стадії ДР 5.4. Після додавання всіх компонентів середовище гомогенізують при ввімкненому перемішувачу пристрої зі швидкістю 150об/хв. У готовому середовищі контролюють температуру та рН.

#### ДР 6. Приготування посівного матеріалу.

##### ДР 6.1. Отримання інокуляту з музейної культури

Інокулят отримують з робочого банку культури продуцента. Пробірку з продуцентом розморожують, після чого висівають мікробіологічною петлею методом штриха на селективне агаризоване середовище LB з додаванням глюкози та хлорамфеніколу (на 1 чашку 20мл LB Agar, 0,25мл 40% глюкози і 6мкл розчину

хлорамфеніколу 34мг/мл вихідного концентрованого розчину) в Чашки Петрі Ч11. Інкують протягом 12-18 год. при температурі 28°C до утворення окремих колоній.

Далі клони інокують бактеріологічною петлею в пробірки П12 з 10мл середовища 2ҮТ, що містить 0,5% глюкози та 10мкг/мл хлорамфеніколу (10мл 2ҮТ, 125мкл 40% розчину глюкози і 3мкл розчину хлорамфеніколу). Інкують при температурі 38°C на шейкері при 100об/хв. протягом 2-3 годин до досягнення культуральною рідиною густини 0,6-1,0 ОГ<sub>590</sub>.

#### ДР 6.2. Вирощування інокуляту в колбах

В підготовлене живильне середовище (стадія ДР 5.5) інокують одержану культуральну рідину у співвідношенні 1/1000 (в колбу К13, яка містить з 400мл середовища додають 400мкл інокуляту). Інкують при температурі 38°C при орбітальному качанні з швидкістю 160об/хв 2-3 години, до досягнення культурою логарифмічної фази росту.

#### ДР 6.3. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі

В інокулятор Ін14 об'ємом 5л стерильно подають 3л живильного середовища, підготованого на стадії ДР 5.5, стерильно переносять інокулят отриманий на стадії ДР 6.2. у співвідношенні 1/10. Вирощують при температурі 38°C, інтенсивності перемішування 250об/хв та аерації 0,03м<sup>3</sup>/л/год впродовж 4-5 годин, до досягнення культурою логарифмічної фази росту.

#### ТП 7. Ферментація

Ферментер Ф16 об'ємом 50л заповнюють стерильно 30л живильного середовища, приготованого на стадії ДР 5.5, та засівають культурою у співвідношенні 1/10, вирощеною в інокуляторі на стадії ДР 6.3. Біосинтез проводять впродовж 14-18 годин до досягнення культуральною рідиною оптичної густини на рівні 2,8-3,3 (ОГ<sub>600</sub>). Ферментер оснащено перемішуючим пристроєм, барботером, терморегулюючою сорочкою та контрольно-вимірювальними пристроями (датчик термопари, рН-метр, датчик рівня, пробовідбірник). Культуру вирощують при температурі 38°C, швидкості перемішування 180об/хв та аерації 0,15м<sup>3</sup>/л/год.

## ТП 8. Осадження біомаси

Клітини біомаси з готової культуральної рідини осаджують центрифугуванням в центрифугі Ц18 при 4000об/хв. протягом 15хв. Надосад зливають та направляють на знешкодження, а відділену біомасу подають на подальшу обробку для виділення рІЛ-7.

## ТП 9. Отримання «тілець включення».

### ТП 9.1. Приготування допоміжних розчинів.

Для отримання тілець включень готують наступні розчини допоміжних речовин: 1М розчин гідроксиду натрію NaOH, 1М розчин хлоридної кислоти HCl, буферний 1М розчин Tris-HCl pH=8,0, 0,5М розчин етилендіанітетраційованої кислоти (ЕДТА), 2М розчин сульфату магнію MgSO<sub>4</sub>, буфер А (1М буферний розчину Tris-HCl pH=8,0, 0,5М розчину ЕДТА та NaCl), буфер В (NaCl, 0,5М розчин EDTA та Triton X-100), буфер С (1М буферний розчин Tris-HCl pH=8,0, та NaCl), буфер D (1М буферний розчин Tris-HCl pH=8,0 та дезоксихолат натрію).

Усі розчини готують в окремих реакторах-змішувачах оснащених магнітним перемішуючим пристроєм, швидкість обертання якого становить 120об/хв. Буферні розчини А, В і С зберігають при температурі 2-8°C, решту – при кімнатній.

### ТП 9.2. Виділення «тілець включень»

#### ТП 9.2.1. Перша відмивка «тілець включень»

Відфільтровану біомасу ресуспендують у реакторі-змішувачі Р19 (оснащеному сорочкою та перемішуючим пристроєм), в який подають буферний розчин А в співвідношенні буфер/вихідна культура 1/5. В буферний розчин безпосередньо перед використанням додають лізоцим до концентрації 1мг/мл. В отриманому буфері А ресуспендують біомасу й інкубують при 2-4°C 30хв (до появи в'язкості у розчині). Потім додають 2М розчину MgSO<sub>4</sub> до кінцевої концентрації 20мМ і ДНКазу до кінцевої концентрації 5мг/л, перемішують при 120об/хв й інкубують при кімнатній температурі (18-20°C) 20хв до повного зникнення в'язкості лізату. Після цього додають буфер В, доводять деіонізованою водою до співвідношення буфер/вихідна культура 1/4 перемішують зі швидкістю

120об/хв та інкубували протягом 12 годин при 4°C. Після інкубування отримані лізати відділяють на центрифугі Ц20 15хв. при 13000об/хв. Надосад зливають та відправляють на знешкодження та переробку, а відфільтровані літази – на подальшу переробку.

#### ТП 9.2.2. Друга відмивка «тілець включень»

Отриманий на попередній стадії осад ресуспендують в буфері С в реакторі-змішувачі Р21 при швидкості перемішування 120об/хв. Після ресуспендування отриману суспензію інкубують протягом однієї год при кімнатній температурі (18-20°C) при швидкості перемішування 50об/хв. Далі, отриману суспензію, осаджують центрифугуванням в центрифугі Ц22 впродовж 15хв при 13000об/хв.

#### ТП 9.2.3. Третя відмивка

Отриманий осад ресуспендують в буфері D в реакторі-змішувачі Р23 при швидкості перемішування 120об/хв. Після ресуспендування отриману суспензію інкубують протягом однієї години при кімнатній температурі (18-20°C) при швидкості перемішування 50об/хв. Отриману суспензію знову осаджують центрифугуванням на Ц24 за наступних умов – 15хв при 13000об/хв.

#### ТП 9.2.4. Четверта відмивка

На останньому етапі відмивки проводять всі маніпуляції з деіонізованою водою. Отриманий осад ресуспендують в деіонізованій воді за допомогою гомогенізатора Р25 при кімнатній температурі (18-20°C) та швидкості перемішування 50об/хв. Вкінці відбирають пробу для перевірки чистоти та вмісту білка в отриманих «тільцях включення» (вміст білка в партії «тілець включення» шляхом денситометрирування SDS-PA гелів). Після ресуспендування отриману суспензію знову інкубують протягом години при кімнатній температурі (18-20°C) та швидкості перемішування 50об/хв. Далі суспензію осаджують центрифугуванням в Ц26 впродовж 15хв при 13000об/хв. Відфільтровані «тільця включення» відправляють на подальшу переробку.



## ТП 10. Ренатурація pIL-7

### ТП 10.1. Приготування буферних та допоміжних розчинів.

Для проведення ренатурації pIL-7 готують наступні допоміжні речовини: 0,1М ацетатний буферний розчин pH=5,0 (ацетат натрію та оцтова кислота), 1М розчин дітіотрієтолу (ДТТ) (ДТТ розчиняють в 1М ацетатному буферному розчині), буферний розчин для розчинення «тілець включення» (гуанидинугідрохлорид, 1М розчин ДТТ, Tween-80 та 1М Tris-HCl pH=8,0) та буферний розчин для урівноваження колонки (дигідрофосфат калію  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1М розчин гідроксиду натрію NaOH, L-аргініну гідрохлорид та Tween-80).

Усі розчини готують на основі деіонізованої води в окремих реакторах-змішувачах оснащених перемішуючим пристроєм, швидкість обертання якого становить 120об/хв. Розчин для урівноваження колонки, попередньо фільтрують на целюлозному мембранному фільтрі та дегазують за допомогою вакуумного насосу. Ацетатний буферний розчин зберігають при температурі 2-8°C, розчин дітіотрієтол – при 20°C, а буферний розчин для розчинення «тілець включення» та розчин для урівноваження колонки готують безпосередньо перед застосуванням.

### ТП 10.2. Солюбілізація «тілець-включення»

Тільця-включення ресуспендують за допомогою гомогенізатора в необхідному об'ємі приготованого буфера й інкубують при 22°C протягом 1-1,5 години (швидкість перемішування 2об/хв) в реакторі-змішувачі P27. По завершенню інкубації отриманий розчин центрифугують на Ц28 при 13200об/хв, 15хв. Отриманий супернатант повинен містити 60-80% цільового білка.

### ТП 10.3. Ренатурація pIL-7 за допомогою гель-фільтрації.

Отриманий після солюбілізації «тілець включення» супернатант наносять на колонку XK50/30 (GE Healthcare) Xk29, запаковану Sephadex G-25 fine (500мл сорбенту). Сорбент попередньо врівноважують 5 об'ємами розчину для урівноваження колонки. На колонку наносять супернатант зі швидкістю нанесення на колонку складає близько 30мл/хв.

Отриманий елюат фільтрують через підготовлений фільтротимач з

встановленою фільтрувальною пластиною 0,45мкм PVDF Фп30, а потім фільтрують через 0,22мкм PVDF целюлозний мембранний фільтр («Millipore») Фп31. Після фільтрації розчин передається для подальшого очищення. Цим закінчується один цикл ренатурації. В залежності від кількості білка та об'єму отриманого розчину після розчинення проводять декілька таких етапів ренатурації.

ТП 11. Перша стадія очистки рІЛ-7 після його ренатурації

ТП 11.1. Приготування буферних та допоміжних розчинів

Для проведення першої стадії очистки готують розчини допоміжних речовин: 1М розчину NaOH, розчин для урівноваження колонок рН=6,8 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1М розчин NaOH, L-аргініну гідрохлорид) та розчин для розведення білка (L-аргініну гідрохлорид, Tween-80, глутатіон окислений та глутатіон відновлений).

Усі розчини готують з використанням деіонізованої води в окремих реакторах-змішувачах оснащених перемішувачим пристроєм (швидкість обертання 120об/хв). Розчин для урівноваження колонки, перед застосуванням, попередньо фільтрують на 0,22 мкм PVDF мембранному фільтрі та дегазують за допомогою вакуумного насосу. Розчин для урівноваження колонки та розведення білка готують безпосередньо перед застосуванням.

ТП 11.2. Упаковка та урівноваження колонок.

Очищення рІЛ-7 проводять у дві стадії з використанням Q сефарози (сильний аніонообмінник) та DEAE сефарози (слабкий аніонообмінник). На першій стадії для проведення очистки рІД-7 в колонку ХК50/30 Хк33 упаковують Q сефарозою WorkBeads™ 40Q, під'єднують до автоматизованої хроматографічної системі FPLC і послідовно промивають наступними розчинами: 5 об'ємами колонки деіонізованої води; 5 об'ємами колонки буфера для урівноваження колонок з 1М NaCl; врівноважують колону пропусканням через неї 5-10 об'ємами колонки буфера для урівноваження колонок.

На другій стадії для проведення очистки рІЛ-7 в колонку ХК26/40 Хк33 упаковувати DEAE сефарозою, під'єднати до автоматизованої хроматографічної системі FPLC і послідовно промивають наступними розчинами: 5 об'ємами

колонки деіонізованої води; 5 об'ємами колонки буфера для урівноваження колонок з 1М NaCl; 5-10 об'ємами колонки буфера для урівноваження колонок.

ТП 11.3. Очистка рІЛ-7 на Q сефарозі та DEAE сефарозі.

Всі роботи по очистці рІЛ-7 проводять при температурі +4°C.

Після фільтрації для замикання дисульфідних зв'язків та зменшення полярності буфера у ренатурованну суміш додають розчин для розведення білка у співвідношенні 1:1 та інкубують впродовж однієї години при +4°C у ректорі-змішувачі Р32 оснащеному перемішуючим пристроєм, швидкість обертання якого становить 120об/хв.

Після інкубування рІЛ-7 пропускають через послідовно приєднані до FPLC системі колонки Хк33 з Q сефарозою та з DEAE сефарозою зі швидкістю 0,5мл/хв. У подальшу роботу відбиралася лише основна частина піку, а його плечі відкидалися.

Всі фракції отримані в результаті хроматографічного очищення рІЛ-7 збирають і аналізують в 13%-му поліакриламідному гелі (SDS-PAG) із використанням спектрофотометра NanoDrop, для визначення чистоти отриманого рІЛ-7.

ТП 12. Друга стадія очистки рІЛ-7 після його ренатурації.

ТП 12.1. Приготування буферних та допоміжних розчинів.

Для проведення другої стадії очищення рІЛ-7 готують наступні допоміжні розчини: 1М розчин гідроксиду натрію NaOH, розчин для урівноваження колонок з pH=6,8 (дигідрофосфат калію  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1М розчин гідроксиду натрію NaOH, L-аргініну гідрохлорид та Tween-80).

Для проведення елюації рІЛ-7 готують розчини з різною концентрацією хлориду натрію та L-аргініну наступного складу:

- $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  pH 6.8, 0,1М L-аргініну, 0,1 % Твін 80 0,1М NaCl;
- $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  pH 6.8, 0,1М L-аргініну, 0,1 % Твін 80 0,2М NaCl;
- $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  pH 6.8, 0,1М L-аргініну, 0,1 % Твін 80 0,3М NaCl;
- $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  pH 6.8, 0,1М L-аргініну, 0,1 % Твін 80 0,4М NaCl;
- $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  pH 6.8, 0,7М L-аргініну, 0,1 % Твін 80 0,4М NaCl;

–  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  pH 6.8, 2,0М L-аргініну, 0,1 % Твін 80 0,4М NaCl.

Усі розчини готують в окремих реакторах-змішувачах оснащених перемішуючим пристроєм, який обертається зі швидкістю 120об/хв. Розчин для урівноваження колонки, перед застосуванням, попередньо фільтрують на 0,22мкм PVDF мембранному фільтрі та дегазують за допомогою вакуумного насосу. Розчин для урівноваження колонки та розведення білка готують безпосередньо перед застосуванням.

#### ТП 12.2. Упаковка та урівноваження колонок.

Для проведення другої стадії очистки в колонку ХК 26/20 Хк33 упаковують SP сефарозою (сильний катіонообмінник), під'єднують до автоматизованої хроматографічної FPLC системі (Pharmacia) і промивають наступними розчинами: 5 об'ємами колонки деіонізованої води; 5 об'ємами колонки буфера для урівноваження колонок, який містить 1М NaCl; 5-10 об'ємами розчину для урівноваження. Швидкість при промиванні і зрівноважуванні колонки становила 1,0мл/хв.

#### ТП 12.3. Нанесення та елюція pIL-7.

Після промивань і врівноваження колонки Хк34 на неї наносили фракцію pIL-7, яку отримують на попередній стадії (ТП 11.3). Елюцію pIL-7 проводять ступінчастим градієнтом хлориду натрію NaCl та L-аргініну, приготованими на ТП 12.1. Швидкість нанесення білка на колонку становила 0,5мл/хв. У подальшу роботу відбиралася основна частина піку, а його плечі відкидається. Чистота білка, на виході після елюції становить близько 80%.

Ті фракції, що містять білок в необхідній кількості та з необхідним ступенем чистоти, передають на фінальну стадію очистки – імуноафінну хроматографію.

#### ТП 13. Імуноафінна очистка pIL-7

##### ТП 13.1. Підготовка буферних та допоміжних розчинів

Для проведення імуноафінної очистки pIL-7 готують наступні розчини допоміжних речовин: розчин з 0,15М хлориду натрію NaCl (pH 7,2-7,4); 0,02М фосфатно-соловий буферний розчином для відмивання колонок (0,15М буферний розчин NaCl, KCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 4М розчин  $\text{MgCl}_2$  для елюції pIL-7 (pH 6,5).

Усі розчини готують в окремих реакторах-змішувачах оснащених перемішуючим пристроєм, швидкість обертання якого 120об/хв. Розчин для відмивання колонки та елюації білка готують безпосередньо перед застосуванням.

#### ТП 13.2. Підготовка імуноафінної колонки.

Для проведення імуноафінної очистки в колонку Хк34 упаковують іммобілізованими анти-ІЛ-7 моноклональними антитілами і промивають 2-ма об'ємами колонки 0,02 М фосфатно-соловим буферним розчином з 0,15М NaCl (рН 7,2-7,4) зі швидкістю 2мл/хв.

#### ТП 13.3. Імуноафінна очистка рІЛ-7

Підготовлений на стадії ТП 12.3 препарат рІЛ-7 зі швидкістю 1мл/хв пропускають через імуноафінну колонку Хк35 підготовлену на попередній стадії. Елюцію рІЛ-7 проводять з швидкістю 2мл/хв розчином 4М MgCl<sub>2</sub>, рН 6,5, і реєструють вихід білка при довжині хвилі 280нм.

Всі фракції отримані в результаті хроматографічного очищення рІЛ-7 збирають і аналізують в 13% поліакриламідному гелі (SDS-PAG) з використанням спектрофотометра NanoDrop. Ступінь чистоти препарату має бути не нижчим за 98%.

#### ТП 14. Переведення очищеного рІЛ-7 у фармацевтичну форму

##### ТП 14.1. Приготування буферних та допоміжних розчинів.

Для отримання фармацевтичної форми рІЛ-7 готують наступні допоміжні та буферні розчини: 1М розчину NaOH, розчин для урівноваження колонок рН=6,8 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1М розчин NaOH, L-аргініну гідрохлорид, NaCl, Tween-80) та буферний розчин для елюації (0,15М NaCl з 0,02М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, рН=7,2-7,4).

Усі розчини готують в окремих реакторах-змішувачах при швидкості перемішування 120об/хв. Розчин для урівноваження колонки, перед застосуванням, попередньо фільтрують на 0,22 мкм PVDF мембранному фільтрі та дегазують за допомогою вакуумного насосу. Розчин для урівноваження колонки готують безпосередньо перед застосуванням.

#### ТП 14.2. Упаковка та урівноваження колонок.

Для переведення рІЛ-7 в фармацевтичну форму в колонку ХК 50/30 Хк36 упаковують Sephadex G-25 fine 500мл сорбенту, приєднують до автоматизованої хроматографічної FPLC системі і промивають наступними розчинами: 5 об'ємами колонки деіонізованої води; 5 об'ємами колонки буфера для урівноваження колонок з 1М вмістом NaCl. Швидкість при промиванні і зрівноважуванні колонки становила 20 мл/хв.

#### ТП 14.3. Нанесення рІЛ-7.

Після промивань і врівноваження колонки Хк36 на неї наносять фракцію рІЛ-7, яка перед цим була очищена на попередніх етапах. Елюацію проводять буферним розчином хлориду натрію з рН 7,2-7,4. Швидкість нанесення розчину на колонку становить близько 15мл/хв.

У подальшу роботу відбирають основну частина піку, а його плечі відкидають. Всі фракції отримані в результаті хроматографічного очищення рІЛ-7 збирають і аналізують в 13%-му поліакриламідному гелі (SDS-PAG) і з використанням спектрофотометра NanoDrop.

Після аналізу, очищений рІЛ-7 направляють на фасування.

#### ТП 15. Фасування та зберігання готової субстанції рІЛ-7

##### ТП 15.1. Стерелізуюча фільтрація і розлив субстанції рІЛ-7 у флакони.

Технологічну стадію розливу субстанції рІЛ-7у флакони проводять у ламінарному боксі (клас чистоти А) розміщеному в приміщенні класу чистоти В по нормам вмісту у повітрі механічних часток та мікробної контамінації. Стерильні флакони та кришки, що надходять з ДР 4, додатково перевіряють на стерильність.

Очищений з рІЛ-7 надходить із стадії ТП 14.3 в стерильній ємності. Перед розлифом субстанцію фільтрують стерелізацією на фільтрах з розмірами пор 0,22мкм. Розлив виконують на робочому столі у ламінарному потоці повітря за допомогою машини наповнення (ПМ-7) ФП37. Об'єм наповнення флаконів перевіряють каліброваним шприцом. Заповнені флакони закупорюють пластиковими кришками на закупорювальній машині ФП38.

ТП 15.2. Маркування та зберігання готового продукту.

Маркування флаконів проводять на напівавтоматі (М-9), де наклеюють етикетку на липкій основі, на якій вказано: виробник, його товарний знак та адресу, назва засобу українською або російською мовами, міжнародну непатентовану назву (МНН), активність засобу в МО, об'єм у мілілітрах, умови зберігання, номер серії, реєстраційний номер, термін придатності, штриховий код. Контроль друку номеру серії та терміну придатності проводять візуально.

Флакони з нечітким, неповним написом направляють на повторне маркування. Флакони з правильним, чітким написом вміщують в лотки та передають на склад для подальшого зберігання та реалізації.

Зберігають засіб в захищеному від світла місці, при температурі 2-8°C.

ТП 16 Контроль якості готової субстанції рІЛ-7.

З кожної партії відбирають зразки препарату та перевіряють якість готової субстанції рІЛ-7 відповідно жл системи оцінки якості ДСТУ ISO 13485:2005 Вироби медичні. Системи управління якістю. Вимоги щодо регулювання [153]. Специфікація якості готової субстанції наведена в таблиці 5.1.

ЗВ 17. Знешкодження відходів та промислових викидів.

На даній стадії відбувається знешкодження та знезараження всіх відходів виробництва та допоміжних робочих розчині перед утилізацією

ПВ 18. Переробка відходів.

## **5.2 Оцінка ризиків виробничого процесу отримання субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини**

Контролювання якості продукції є однією з обов'язкових складових виробничого процесу, а її відсутність може поставити під сумнів безпечність продукції, що випускається. Одним з ключових параметрів управління якістю на етапі проектування виробництва та однією з важливих умов його організації є система оцінки можливих ризиків, які впливають на роботу підприємства, якість кінцевої продукції та, як наслідок, техніко-економічні показники технології.

Оцінка ризиків дозволяє виявити критичні точки виробничого циклу, оцінити ступінь шкоди на кінцевий продукт та вагу впливу різних критичних точок виробництва, а також вжити необхідних заходів для запобігання їх виникнення або невілювання їх негативного впливу.

Таблиця 5.1 – Специфікація якості на субстанцію рІЛ-7

<b>Показники контролю</b>	<b>Встановлені значення</b>	<b>Методи контролю</b>
Органолептичні показники	Прозора безбарвна рідина, можлива слабка опалесценція, без механічних включень видимих неозброєним оком	Візуально, органолептично
Водневий показник, одиниці рН	6,0-7,5	ДФУ 2.0, 2.2.3
Ідентифікація	Має проявляти специфічну біологічну активність	Методика [92]
Специфічна активність	Від 80 % до 125 % від номінального значення	Методика [92]
Концентрація рІЛ-7	Від 1 до 10 мг/мл	ДФУ 2.0, 2.2.25, спектрофотометрично
Стерильність	Має бути стерильним	ДФУ 2.0, 2.6.1, метод прямого висівання
Аномальна токсичність	Відсутність токсичності на мишах	ДФУ 2.0, 2.6.9
Ступінь чистоти	Вміст рІЛ-7 на електрофореграмі у відновлюваних умовах при внесенні в лунку 40 мкг субстанції повинен складати не менше 98%	ДФУ 2.0, 2.2.31, методом ДСН-ПАГ
Бактеріальні ендотоксини	Менше 100 МО/мг рІЛ-7	ДФУ 2.0, 2.6.14, метод А – гель-тромб метод: граничне випробування

Оскільки виробництво субстанції рІЛ-7 відноситься до фармацевтичних технологій, доцільно користуватися нормативними документами, які регламентують виробництво лікарських засобів, а саме: «Настанова СТН МОЗУ 42-4.0:2016. Лікарські засоби. Належна виробнича практика», ДСТУ ISO 9001:2015 «Системи управління якістю. Вимоги» [154, 155].



У більшості випадків контроль ризиків зводиться до ідентифікації критичних елементів виробничого процесу та ретельного контролю цих елементів, що можна здійснити використовуючи методи системи аналізування ризиків та критичних контрольних точок (Hazard Analysis and Critical Control Point, НАССР), яка передбачає систематичний підхід до ідентифікації, оцінювання та контролювання небезпек. Основні принципи НАССР включають: аналізування небезпек та визначення запобіжних заходів; визначення критичних контрольних точок (ККТ); встановлення критичних обмежень; моніторинг кожної ККТ; визначення коригуючих дій; визначення процедур контролю; визначення процедур ведення записів та документації.

Отже, вихідною точкою для оцінки ризиків є аналіз технологічного процесу виробництва рІЛ-7. Технологічна схема (ТС) виробництва наведена на рис. 5.1. Загалом вона є типовою схемою виробництва рекомбінантних білків у мікробних системах експресії, проте має ряд особливостей пов'язаних використанням конкретного продуценту, що потребує забезпечення більш жорстких умов контролю процесу та вимагає відсутності мікробіологічної та/або хімічної контамінації впродовж усього виробничого циклу.

Проаналізувавши технологічну схему, ми визначили наступні ККТ:

- підготовка виробництва, сировини та матеріалів (підготовка персоналу, обладнання, миючих та дезінфікуючих засобів, пакувальних матеріалів, води та повітря відноситься до базових стацій виробництва, а відтак неякісна первинна підготовка може призвести до появи мікробіологічної та/або хімічної контамінації) (очікуваний ризик  $R_1$ );
- підготовка живильного середовища (на цій стадії виробничі ризики пов'язані з дотриманням необхідності правильного зважування відповідних речовин, дотримання технологічного процесу приготування та забезпечення режимів стерилізації, що може спричинити появу його мікробіологічної та/або хімічної контамінації) (очікуваний ризик  $R_2$ );
- підготовка посівного матеріалу (ризики даної стадії можуть бути зумовлені можливістю появи мікробіологічної та/або контамінації, а

- також відхилень в проведенні технологічного процесу) (очікуваний ризик  $R_3$ );
- біосинтез рекомбінантного ІЛ-7 (на цій стадії ризики можуть бути адресовані до появи мікробіологічної та/або хімічної контамінації або відхилень в дотриманні технологічного процесу) (очікуваний ризик  $R_4$ );
  - виділення та очистка готової продукції (ризики даної стадії пов'язані з необхідністю правильного приготування розчинів допоміжних речовин, дотриманням технологічного процесу при проведенні кожної з стацій та можливістю появи хімічної та/або мікробіологічної контамінації) (очікуваний ризик  $R_5$ );
  - розлив готової продукції у флакони та їх закупорювання (на цій стадії ризики обумовлені можливістю мікробіологічної та/або хімічної контамінації продукту та відхиленням від технології) (очікуваний ризик  $R_6$ ).

Варто зазначити, що ризиком ми називаємо вірогідність виникнення шкоди і ступінь тяжкості цієї шкоди, а процес порівняння визначеного ризику з існуючими критеріями ризику для визначення припустимості ризику називаємо оцінкою ризику [153]. Таким чином на оцінку рівня ризику впливають два фактори: вірогідність виникнення та ступінь шкоди, завданої виникненням ризику.

Виходячи з рекомендацій наведених в нормативних документах [155], особливостей продукту, що виробляється, та опираючись на досвід аналогічних виробництв [153], доцільно використовувати якісний підхід до аналізування ризиків. Тому, обираємо підхід з використання N-M матриці для опису вірогідності та тяжкості ризику у кожній ККТ, зазначених раніше. Усі можливі рівні тяжкості, викликані ризиком, розділимо на три категорії: значний (зворотна значна шкода або відсутність ефективності препарату), помірний (зворотна незначна шкода), незначний (не призводить до шкоди). Якісну ймовірність виникнення шкоди також розділимо на три рівні: високий (можливий, трапляється

часто), середній (можливий, але не часто трапляється), низький (навіть чи трапляється, рідко). Проаналізувавши, ККТ за критеріями наведеними вище, було виявлено два найбільш критичні процеси, а саме: підготовка посівного матеріалу (ДР 6) та ферментація (ТП 7) (табл. 5.2). Також, до критичних стадій виробництва можемо віднести: підготовку поживного середовища (ДП 5) та виділення й очистку ІЛ-7 (ТП 8-14).

Таблиця 5.2 – Матриця ризиків виробничого процесу отримання ІЛ-7

		Якісні рівні тяжкості		
		незначний	помірний	значний
Якісні рівні вірогідності	високий		R <sub>5</sub>	R <sub>3</sub> , R <sub>4</sub> , R <sub>6</sub>
	середній		R <sub>2</sub>	
	низький		R <sub>1</sub>	

На основі даних отриманих вище, виявлено, що для зменшення вірогідності прояви ризику, необхідно взяти ряд запобіжних заходів, основним з яких є виявлення та контроль тих параметрів технологічного процесу, які призведуть до появи ризиків. Тому ми пропонуємо ввести на кожній з стадій виробництва низку контрольних точок, наведених в таблиці 5.3. Перелік найважливіших контрольних точок наведено для найбільш критичних стадій виробничого процесу (ДР 6-5 та ТП 7-15), визначених вище. Ефективність запропонованих нами критичних точок було перевірено на трьох послідовних дослідно-промислових серіях виробництва. Будо встановлено, що фактичні значення параметрів відповідають нормативним значенням. Це свідчить про можливість ефективного виробництва препарату в промислових умовах.

Таблиця 5.3 – Перелік контрольних точок виробництва субстанції рІЛ-7.

Стадія та підстадія технологічного процесу	Контрольна точка	Параметр для контролювання	Нормативне значення параметру	Методи контролю і/або прилад	Періодичність контролю
ДР 5 Приготування живильного середовища. ДР 5.1 Приготування компонентів живильного середовища	Кт 5.1.1	Температура	134÷136°C	Термометр	Кожна серія
	Кт 5.1.2	Стерильність	Стерильно	ДФУ 2.0, 2.6.1	Періодично
ДР 5 Приготування живильного середовища. ДР 5.2 Приготування вуглецевмісних компонентів живильного середовища	Кт 5.2.1	Температура	34÷36°C	Термометр	Кожна серія
	Кт 5.2.2	Цілісність фільтрів*	Відсутність механічних дефектів	Дифманометр	Періодично
	Кт 5.2.3	Стерильність	Стерильно	ДФУ 2.0, 2.6.1	Періодично
ДР 5 Приготування живильного середовища. ДР 5.4 Приготування фіто-та вітамінних добавок	Кт 5.4.1	Цілісність фільтрів*	Відсутність механічних дефектів	Дифманометр	Періодично
	Кт 5.4.2	Стерильність	Стерильно	ДФУ 2.0, 2.6.1	Періодично
ДР 6 Приготування посівного матеріалу	Кт 6.1.1	Температура	37÷39°C	Термометр	Кожна серія
	Кт 6.1.2	Стерильність	Стерильно	ДФУ 2.0, 2.6.1	Періодично
	Кт 6.1.3	Швидкість перемішування	250±5об/хв	Анемометр	Кожна серія
	Кт 6.1.4	Рівень аерації	0,03±0,01м³/л/год	Манометр	Кожна серія

Продовження таблиці 5.2

Стадія та підстадія технологічного процесу	Контрольна точка	Параметр для контролювання	Нормативне значення параметру	Методи контролю і/або прилад	Періодичність контролю
ТП 7 Ферментація	КТ 7.1.1	Температура	37÷39°C	Термометр	Кожна серія
	КТ 7.1.2	Стерильність	Стерильно	ДФУ 2.0, 2.6.1	Періодично
	КТ 7.1.3	Швидкість перемішування	180±5об/хв	Анеометр	Кожна серія
	КТ 7.1.4	Рівень аерації	0,15±0,01м³/л/год	Манометр	Кожна серія
ТП 8 Осадження біомаси	КТ 8.1.1	Швидкість центрифугування	4000±10об/хв	Анеометр	Кожна серія
ТП 9 Отримання "тілець включення"	КТ 9.1.1	Кислотність	pH 8±0,1	ДФУ 2.0, 2.2.3, pH-метр	Кожна серія
	КТ 9.1.2	Температура	2÷4°C	Термометр	Кожна серія
	КТ 9.1.3	Температура	18÷20°C	Термометр	Кожна серія
	КТ 9.1.4	Швидкість центрифугування	13000±10об/хв	Анеометр	Кожна серія

Продовження таблиці 5.2

Стадія та підстадія технологічного процесу	Контрольна точка	Параметр для контролювання	Нормативне значення параметру	Методи контролю і/або прилад	Періодичність контролю
ТП 10 Ренатурація рІЛ-7	КТ 10.1.1	Кислотність	pH 8±0,1	ДФУ 2.0, 2.2.3, рН-метр	Кожна серія
	КТ 10.1.2	Температура	22±1°C	Термометр	Кожна серія
	КТ 10.1.3	Чистота білка	60±0,1%	Спектрофотометр	Кожна серія
	КТ 10.1.4	Цілісність фільтрів*	Відсутність механічних дефектів	Дифманометр	Періодично
	КТ 10.1.5	Швидкість нанесення на колону	30±1мл/хв	Витратомір	Кожна серія
	КТ 8.1.1	Швидкість центрифугування	13200±10об/хв	Анемометр	Кожна серія
ТП 11 Перша стадія очищення рІЛ-7	КТ 11.1.1	Кислотність	pH 6,8±0,1	ДФУ 2.0, 2.2.3, рН-метр	Кожна серія
	КТ 11.1.2	Температура	4±0,5°C	Термометр	Кожна серія
	КТ 11.1.3	Чистота білка	75÷80%	Спектрофотометр	Кожна серія
	КТ 11.1.4	Швидкість нанесення на колону	5±0,1мл/хв	Витратомір	Кожна серія
ТП 12 Друга стадія очищення рІЛ-7	КТ 12.1.1	Кислотність	pH 6,8±0,1	ДФУ 2.0, 2.2.3, рН-метр	Кожна серія
	КТ 12.1.2	Чистота білка	95±0,1%	Спектрофотометр	Кожна серія
	КТ 12.1.3	Швидкість нанесення на колону	5±0,1мл/хв	Витратомір	Кожна серія

Продовження таблиці 5.2

Стадія та підстадія технологічного процесу	Контрольна точка	Параметр для контролювання	Нормативне значення параметру	Методи контролю і/або прилад	Періодичність контролю
ТП 13 Імуноафінна очищення рІЛ-7	КТ 13.1.1	Кислотність	pH 7,2÷7,4	ДФУ 2.0, 2.2.3, рН-метр	Кожна серія
	КТ 13.1.2	Кислотність	pH 6,5±0,1	ДФУ 2.0, 2.2.3, рН-метр	Кожна серія
	КТ 13.1.3	Чистота білка	99,9±0,1%	Спектрофотометр	Кожна серія
	КТ 13.1.4	Швидкість нанесення на колону	2±0,1мл/хв	Витратомір	Кожна серія
ТП 14 Отримання фармацевтичної форми рІЛ-7	КТ 14.1.1	Кислотність	pH 6,8±0,1	ДФУ 2.0, 2.2.3, рН-метр	Кожна серія
	КТ 14.1.2	Чистота білка	≥98%	Спектрофотометр	Кожна серія
	КТ 14.1.3	Швидкість нанесення на колону	15±1мл/хв	Витратомір	Кожна серія
ТП 15 Фасування та зберігання готової субстанції рІЛ-7	КТ 15.1.1	Цілісність фільтрів**	Відсутність механічних дефектів	Дифманометр	Періодично

Примітки:

1.\* – у процесі фільтрації послідовно використовуються фільтри із розміром пор 0,45мкм та 0,22мкм.

2.\*\* – для профедення стадії ТП15 використовуються фільтри із розміром пор 0,22мкм.

## Висновки до розділу 5

Розроблено технологію отримання субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини шляхом біосинтезу бактеріального продуценту *E. coli*. Представлено послідовність проведення підготовчих процесів виробництва та основних технологічних операцій для здійснення біосинтезу та виділення й очистки цільового продукту. При розробці технології було враховано результати досліджень описані в попередніх розділах. На основі прийнятих рішень спроектовано технологічну та апаратурно-технологічну схеми виробництва, які дозволяють здійснити процес при мінімальних затратах на його проведення.

Здійснено стандартизацію виробництва рІЛ-7, оцінено можливі ризики процесу та проведено перспективну валідацію, для запобігання уникнення їх появи. Надано рекомендації по контролю основних технологічних параметрах на критичних стадіях виробництва. Усі прийняті проектні рішення дозволяють говорити про можливість отримання високоякісного кінцевого продукту, придатного для подальшого застосування при виробництві лікарських засобів.

### Результати, отримані у даному розділі, опубліковані у таких працях:

1. Луценко ТМ, Горшунов ВЮ, **Мотроненко ВВ**, Галкін ОЮ. Оцінка ризиків у технології препарату на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та її перспективна валідація. Наукові вісті НТУУ "КПІ". 2017;3:56-63.



## 6 ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНА ОЦІНКА ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРЛЕЙКІНУ-7 ЛЮДИНИ

### 6.1 Розрахунок потреби населення у препаратах ІЛ-7

Препарати рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини є одними із перспективних лікарських засобів для комплексної терапії солідних пухлин (гліома, меланома, гліобластома тощо), інфекційних захворювань (гепатити В та С) та ранових інфекцій викликаних бактеріальними збудниками.

Далі пропонуємо обґрунтування та розрахунок потреби у препаратах ІЛ-7 для України. Будемо виходити із того, що препарат ІЛ-7 є новим для ринку й, відповідно, поінформованість професійної медичної спільноти про новий терапевтичний підхід є мінімальною, що передбачатиме вкрай інтенсивну та тривалу маркетингову кампанію. Таким чином, вважаємо, що у перші роки виробництва та реалізації такого препарату його буде призначено лише 10% від загальної кількості хворих на відповідні захворювання.

У 2018 році в Україні було зареєстровано 128554 пацієнти зі злоякісними солідними новоутвореннями [157]. Тоді, виходячи з сказаного вище, кількість пацієнтів, які будуть отримувати лікування препаратами ІЛ-7 складатиме:

$$128554 \cdot 0,1 = 12855 \text{ пацієнтів.}$$

Відповідно до даних літератури [157, 158] для лікування солідних пухлин використовують разову дозу ІЛ-7 у кількості 3-60мкг на кілограм маси тіла пацієнта (приймаємо для розрахунків середнє значення у кількості 30мкг на кг маси пацієнта) через добу. Загальний курс лікування складає 8 доз [157]. З урахуванням, що середня маса тіла дорослої людини становить 70кг, розрахуємо річну потребу в субстанції ІЛ-7 для лікування онкохворих:

$$12855 \cdot 70 \cdot 30 \cdot 10^{-6} \cdot 8 = 219,049 \text{ г.}$$

У 2017 році в Україна було зареєстровано 6184 хворих на гепатит С [159] та 2920 на гепатит В [160]. Розрахуємо кількість пацієнтів, які будуть отримувати лікування препаратами ІЛ-7:

$$(6184 + 2920) \cdot 0,1 = 911 \text{ пацієнтів.}$$

Відповідно до дослідів літературних даних [158] для лікування гепатиту В та С разова доза ІЛ-7 складає від 3 до 20мкг на кілограм маси тіла пацієнта (приймаємо для розрахунків середнє значення у кількості 10мкг на кг маси пацієнта) один раз в тиждень. Загальний курс лікування складає 4 тижні [158]. З урахуванням, що середня маса тіла дорослої людини становить 70кг, розрахуємо річну потребу в ІЛ-7 для лікування хворих на вірусні гепатити:

$$911 \cdot 70 \cdot 10 \cdot 10^{-6} \cdot 4 = 2,551 \text{ г.}$$

У 2018 році в Україна було зареєстровано близько 4000 хворих на гнійні ранові інфекції [161]. Відповідно, кількість пацієнтів, які будуть отримувати лікування препаратами ІЛ-7, становитиме 400 осіб.

Згідно даних літератури [158] для лікування гнійних інфекцій доза ІЛ-7 складає 10мкг на кілограм маси тіла пацієнта 4 рази на тиждень. Загальний курс лікування складає 3 тижні. Отже, річна потреба у субстанції ІЛ-7 для лікування хворих із рановими інфекціями становитиме:

$$400 \cdot 70 \cdot 10 \cdot 10^{-6} \cdot 4 \cdot 3 = 3,36 \text{ г.}$$

Загальна річна потреба в субстанції ІЛ-7 для лікування хворих в Україні становитиме:

$$219,049 + 2,551 + 3,36 = 224,96 \text{ г.}$$

Приймаємо, що загальна запланована потужність цеху по виробництву субстанції ІЛ-7 повинна складати:

$$M = 225 \text{ г/рік}$$

## 6.2 Розрахунок виробничої потужності

Розраховуємо вихід ІЛ-7 за один виробничий цикл, з урахуванням, що вихід субстанції ІЛ-7 складає 1,25г/л:

$$ПЦ = 1,25 \cdot V_n \cdot K_z = 1,25 \cdot 50 \cdot 0,65 = 40,625 \text{ г,}$$

де  $V_n$ , л – номінальний об'єм виробничого ферментеру;

$K_z$  – коефіцієнт заповнення ферментеру.

Необхідна кількість виробничих циклів для забезпечення потреб населення:

$$\mathcal{C} = \frac{M}{\text{ПЦ}} = \frac{225}{40,625} = 5,54 \text{ циклів/рік.}$$

Приймаємо:  $\mathcal{C} = 6$  цикли/рік. Тоді річний випуск субстанції ІЛ-7 складатиме:

$$\text{ПП} = \mathcal{C} \cdot \text{ПЦ} = 6 \cdot 40,625 = 243,75 \text{ г/рік.}$$

З урахуванням втрат приймаємо  $\text{ПП} = 240 \text{ г/рік.}$  Та, обираємо періодичний режим роботи цеху [161].

### 6.3 Розрахунок ефективного фонду робочого часу цеху

З урахуванням того, що цех працює періодично, а на проведення одного виробничого циклу необхідно 360 год. (розраховується виходячи з тривалості технологічного процесу), ефективний фонд робочого часу становить [162]:

$$T_{ef} = \mathcal{C} \cdot \tau_u = 6 \cdot 360 = 2160 \text{ год.}$$

Основна характеристика режиму роботи цеху наведена в таблиці 6.1.

Таблиця 6.1 – Річний фонд робочого часу цеху

Показник	Норма робочого часу
Календарний фонд робочого часу цеху, діб	90
Тривалість робочого дня цеху, год	24
Календарний фонд робочого часу цеху, год/рік	2160
Річний фонд робочого часу цеху, год	2160

Розрахунок робочого часу цеху для виробництва субстанції ІЛ-7 проводимо з урахуванням того, що у періоди простою на обладнанні цеху проводиться виробництво інших препаратів з аналогічними технологічними стадіями та процесами, а виробництво самої субстанції ІЛ-7 триває 90 діб (по 15 діб на кожен цикл). Виконання планово-попереджувальних ремонтів здійснюється в періоди

простою обладнання. Тривалість роботи цеху складає 24 год./добу, оскільки деякі технологічні процеси тривають довше, ніж одна робоча зміна працівника (8 год.) [162].

#### 6.4 Аналіз техніко-економічних показників

Аналіз основних техніко-економічних показників виробництва наведений в таблиці 6.2.

Таблиця 6.2 – Техніко-економічні показники виробництва

Показник	Значення показників проектного цеху
Річний випуск продукції, г/рік	240
Чисельність персоналу за списком, осіб.	55
Середньорічний виробіток робітника, г/рік	4,26
Капіталовкладення у проект, грн.:	
- всього, грн.	3 025 616
- на одиницю продукції, грн./г	12 607
Загальна собівартість продукту:	
- всього, грн.	10 434 695
- на одиницю продукції, грн./г	43 478
Ринкова вартість продукту, грн./г	45 000
Прибуток:	
- всього, грн.	365 305
- на одиницю продукції, грн./г	1 522
Рентабельність продукту, %	3,5
Термін повернення капіталовкладень, років	8,28

Примітка. Ринкову вартість продукту встановлюємо виходячи з міркувань, щоб термін повернення капіталовкладень становив близько 10 років [162].

#### 6.5 Розрахунок собівартості продукту і вартості проекту

До собівартості продукції входять вартість основних виробничих фондів цеху, оборотні кошти та оборотні фонди, а також опосередковані витрати (вартість утримання адміністративно-управлінського персоналу та інші витрати, які неможливо безпосередньо віднести на собівартість готової продукції).

### 6.5.1 Розрахунок вартості сировини, матеріалів та напівфабрикатів

Розрахунок витрат сировини, матеріалів, напівфабрикатів базується на нормах витрат, встановлених галузевими нормативами, стандартами та технологічним регламентом цеху. Результати розрахунків представлені в таблиці 6.3.

### 6.5.2 Розрахунок вартості палива та енергії

Потреба в електроенергії, що витрачається на освітлення, визначається за формулою [162]:

$$E = \frac{T \cdot S \cdot a \cdot K \cdot 1,02 \cdot 1,05}{1000},$$

де  $T$  – час роботи штучного освітлення, год.;

$S$  – площа, яка освітлюється, м<sup>2</sup>;

$a$  – потужність на 1м<sup>2</sup> поверхні, Вт (8...15Вт);

$K$  – коефіцієнт одночасного горіння (0,8...0,85);

1,02 – коефіцієнт, який враховує чергове освітлення.

Споживачі електроенергії для освітлення:

– виробництво:

$$E_{\text{в}} = \frac{2160 \cdot 200 \cdot 15 \cdot 0,85 \cdot 1,02 \cdot 1,05}{1000} = 5900 \text{ кВт};$$

– заводоуправління:

$$E_{\text{з}} = \frac{720 \cdot 20 \cdot 15 \cdot 0,8 \cdot 1,02 \cdot 1,05}{1000} = 1970 \text{ кВт};$$

Разом електроенергії, що витрачається на освітлення:

$$E = E_{\text{в}} + E_{\text{з}} = 5900 + 1970 = 7850 \text{ кВт}.$$

Результати розрахункових потреб у силовій електроенергії наводять у вигляді таблиці 6.4.

Таблиця 6.3 – Розрахунок вартості сировини, матеріалів та напівфабрикатів

Сировина, матеріали та напівфабрикати	Одиниця	Витрати на річний випуск (80г)		Витрати на одиницю продукції (за 1 цикл – 40г)		
		Кількість, од.	Сума, грн.	Кількість, од.	Ціна, грн./од	Сума, грн.
1. Основна сировина та матеріали						
Компоненти живильного середовища	кг	19,20	62 976	3,20	3 280	10 496
Компоненти розчинів для виділення та очистки	кг	120,00	66 000	20,00	550	11 000
Фільтрувальні матеріали	шт.	48,00	232 800	8,00	4 850	38 800
Пакувальні матеріали	шт.	24,00	1 200	4,00	50	200
2. Допоміжні матеріали						
Запасні частини	шт.	-	150 000	-	-	25 000
Синтетичні миючі засоби	л	6	390	1,00	65	65
Перекис водню	л	6	480	1,00	80	80
Усього	-	-	513 846	-	-	85 641

Таблиця 6.4 – Розрахунок потреби силової електроенергії

Найменування	Потужність, кВт	Кількість, шт.	Коефіцієнт попиту	Коефіцієнт збільшення потужності	Загальна потужність обладнання, кВт	Ефективний час роботи, год./рік	Витрати електроенергії на одиницю обладнання, кВт/рік	Загальні витрати електроенергії, кВт/рік	Вартість електроенергії, грн./рік
Реактор-змішувач	18,5	10	0,9	1,1	22,6	720	16 280	162 800	345 136,00
Реактор-змішувач з сорочкою	18,5	2	0,9	1,1	22,6	720	16 280	32 560	69 027,20
Фільтр касетний	14	2	0,9	1,1	17,1	540	9 240	18 480	39 177,60
Інокулятор	19,5	1	0,9	1,1	23,8	108	2 574	2 574	5 456,88
Ферментер	19,5	1	0,9	1,1	23,8	108	2 574	2 574	5 456,88
Центрифуга осаджувана	29	1	0,9	1,1	35,4	1080	38 280	38 280	81 153,60
Хроматографічна колонка	17	5	0,9	1,1	20,8	120	2 493	12 467	26 429,33
Невраховане електрообладнання	-	-	-	-	-	-	-	26 973	57 183,75
<b>Сума</b>	<b>-</b>	<b>22</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>296 708</b>	<b>629 021,24</b>

Потреби у питній і побутовій воді та тепловій енергії для опалення обумовлені санітарними нормами і правилами. Інші види енергоносіїв на підприємстві не використовуються. Повна вартість енерговитрат наведена в таблиці 6.5.

Таблиця 6.5 – Розрахунок вартості енерговитрат

Вид енерговитрат, од. виміру	Витрати на рік, од.	Вартість одиниці, грн.	Вартість за рік, грн.
Електроенергія силова, кВт·год	296708	2,12	629021,24
Електроенергія освітлювальна, кВт·год	7870	1,76	13851,20
Водопостачання та водовідведення, м <sup>3</sup>	30	20,82	624,60
Теплова енергія, Гкал	30	1655	49650,00
<b>Всього</b>	-	-	<b>693 147*</b>

Приміткаю \* – загальну суму затрат заокруглюємо до найближчого цілого значення

### 6.5.3 Розрахунок заробітної плати виробничих працівників

Фонд заробітної плати виробничих працівників (безпосередньо зайнятих виробництвом продукції) розраховують, виходячи з їх чисельності за списком, тарифного розряду, тарифної ставки, кількості робочих днів, відпрацьованих одним працівником протягом року з урахуванням режиму роботи підприємства. В умовах безперервного виробництва встановлюється трьох змінна система обслуговування робочих місць по 8 годин (з 23.00 до 7.00 – 1 зміна, з 7.00 до 15.00 – 2 зміна, з 15.00 до 23.00 – 3 зміна). Робочі місця обслуговуються 4-ма бригадами, з яких 3 працюють добу, а 1 – відпочиває. Кожна з бригад, відпрацювавши в даній зміні 4 дні, відпочиває 48 годин і переходить у наступну зміну, де також працює 4 дні. Графік змінності основних виробничих працівників наведений у таблиці 6.6.



Таблиця 6.6 – Графік змінності основних виробничих працівників

Дні	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Бригади																
I	1	1	1	1	В	2	2	2	2	В	3	3	3	3	В	В
II	В	2	2	2	2	В	3	3	3	3	В	В	1	1	1	1
III	2	В	3	3	3	3	В	В	1	1	1	1	В	2	2	2
IV	3	3	В	В	1	1	1	1	В	2	2	2	2	В	3	3

Виходячи з режиму роботи працівника та режиму роботи підприємства (табл. 6.7), розраховуємо річний фонд робочого часу одного працівника. Розрахунок чисельності працівників проводять на підставі норм виробітку, норм обслуговування та апаратури.

Ефективний фонду робочого часу робітника в нормальних умовах праці протягом року становить:

$$T_{\text{еф}} = 70 \cdot 8 = 560 \text{ год./рік}$$

де 70 – кількість днів роботи одного працівника в нормальних умовах праці протягом року для виробництва ІЛ-7; 8 – тривалість робочої зміни, год./добу.

Таблиця 6.7 – Режим роботи та річний фонд робочого часу одного працівника

Показник	Тривалість, діб/рік, в умовах безперервного режиму роботи (тривалість робочої зміни 8 год.)
Календарний час роботи підприємства, днів	90
Неробочі дні з розрахунку на одного працівника, днів:	
- вихідні	18
- святкові	-
Номінальний фонд робочого часу, днів	72
Цілоденні невиходи на роботу, днів:	
- в зв'язку з хворобою	1,5
- з інших причин	0,5
Час роботи одного працівника, днів	70

Оскільки, кількість робочих днів працівника (70 дні) менша за номінальну (72 дні), то працівники не доопрацьовують до норми, а отже не отримують надбавок та премій.

Розраховуючи фонд оплати праці, враховують явочну чисельність персоналу, чисельність його за списком, місячний оклад та тарифні розряди. При переході від явочного числа до числа по списку, необхідно розрахувати перехідний коефіцієнт:

$$90/70 = 1,29.$$

Різниця між числом по списку та явочним числом робітників дає кількість допоміжних робітників для підзмін.

Підчас розрахунку оплати праці враховують норми мінімальної заробітної плати в Україні. На січень 2020 року мінімальна заробітна плата становить 28,31грн./год [163]. Тарифна сітка працівників з коефіцієнтами за розрядом вказано в таблиці 6.8. Розрахунок чисельності робітників цеху та фонду оплати праці представлено в таблиці 6.9 і таблиці 6.10, відповідно.

Таблиця 6.8 – Тарифна сітка розрядів і коефіцієнтів з оплати праці працівників

<b>Розряд</b>	<b>25</b>	<b>22</b>	<b>19</b>	<b>17</b>	<b>16</b>	<b>13</b>
Коефіцієнт	4,51	4,06	3,42	3	2,79	2,27
Тарифна ставка, грн./год	127,68	114,94	96,82	84,93	78,98	64,26

#### **6.5.4 Розрахунок витрат на утримання та експлуатацію обладнання**

При обчисленні вартості устаткування до первісної вартості додаються транспортно-заготівельні витрати у розмірі 10% прејскурантної вартості. Крім цього, повна вартість устаткування включає також витрати на монтаж (20%), трубопроводи (5%), КВП та їх монтаж (10%), спецроботи (10%). До спеціальних робіт належать закладення фундаментів, антикорозійні роботи, ізоляція тощо. Розрахунок балансової вартості устаткування та суми амортизаційних

відрахувань наведено у таблиці 6.10. Норма амортизації для кожного устаткування індивідуальна, залежить від його типу [162].

Кошторис витрат на утримання та експлуатацію устаткування представлений в таблиці 6.11.

Таблиця 6.11 – Кошторис витрат на утримання та експлуатацію устаткування

Стаття витрат	Сума, грн.
1. Утримання та витрати на експлуатацію виробничого устаткування, апаратури і транспорту:	
- заробітна плата працівників по догляду за устаткуванням;	4 565 875
- нарахування на заробітну плату (соціальне страхування);	1 712 203
- РМЦ (2% від вартості устаткування )	60 512
<b>Разом по ст. 1:</b>	<b>6 338 590</b>
2. Амортизація виробничого устаткування, апаратури та транспортних засобів	486 647
<b>Разом по ст. 1-2:</b>	<b>6 825 237</b>
3. Внутрішньозаводське переміщення вантажів, відшкодування зносу малоцінних, швидкозношуваних інструментів, пристосувань, а також інші витрати, пов'язані з утриманням та експлуатацією устаткування (3% суми витрат за попередніми статтями)	204 757
<b>Разом по кошторису:</b>	<b>7 029 994</b>

### 6.5.5 Розрахунок цехових витрат

Цехові витрати включають основну та додаткову заробітну плату цехового персоналу, витрати на утримання і поточне налагодження виробничих будинків і споруд, амортизацію виробничих будинків і споруд та витрати на охорону праці [162].

Розрахунок вартості будівель не проводили виходячи із того, що виробництво буде організоване у цеху вже існуючого підприємства і не потребує будівництва окремого приміщення.

Кошторис цехових витрат наведений у таблиці 6.12.

Таблиця 6.9 – Розрахункова чисельність працівників цеху

Професія	Тарифний розряд	Розрахунок кількості працівників						
		Кількість працівників на зміні, осіб	Кількість змін на добу	Явочна кількість робітників, осіб	Календарний час роботи підприємства, днів	Перехідний коефіцієнт	Кількість робочих днів працівника за рік	Кількість робітників за списком, осіб
Головний технолог	25	1	1	1	90	1,29	70	2
Головний інженер	25	1	1	1	90	1,29	70	2
Начальник цеху (керівник бригади)	22	1	3	3	90	1,29	70	5
Технолог	19	1	3	3	90	1,29	70	5
Лаборант	16	3	3	9	90	1,29	70	13
Інженер	19	1	3	3	90	1,29	70	5
Апаратник	16	3	3	9	90	1,29	70	13
Електрик	17	1	3	3	90	1,29	70	5
Прибиральник	13	1	3	3	90	1,29	70	5
<b>Разом</b>	<b>-</b>	<b>13</b>	<b>-</b>	<b>35</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>55</b>

Таблиця 6.10 – Розрахунок фонду оплати праці робітників цеху

Професія	Розрахунок фонду заробітної плати							
	Тарифна ставка, грн.	За робочу зміну, грн.	Тарифний фонд зарплати, грн.	Доплата до тарифного фонду (40 %), грн.	Додаткова зарплата (20 %), грн.	Основний фонд зарплати на особу, грн.	Разом фонд зарплати, грн.	Відрахування на соціальне страхування, грн. (37,5%)
Головний технолог	127,68	1 021	71 500	28 600	20 020	120 120	240 239	90 090
Головний інженер	127,68	1 021	71 500	28 600	20 020	120 120	240 239	90 090
Начальник цеху (керівник бригади)	114,94	920	64 366	25 746	18 022	108 134	540 671	202 752
Технолог	96,82	775	54 219	21 688	15 181	91 088	455 442	170 791
Лаборант	78,98	632	44 232	17 693	12 385	74 309	966 017	362 256
Інженер	96,82	775	54 219	21 688	15 181	91 088	455 442	170 791
Апаратник	78,98	632	44 232	17 693	12 385	74 309	966 017	362 256
Електрик	84,93	679	47 561	19 024	13 317	79 902	399 511	149 817
Прибиральник	64,26	514	35 988	14 395	10 077	60 459	302 296	113 361
<b>Разом</b>	<b>-</b>	<b>6 969</b>	<b>487 815</b>	<b>195 126</b>	<b>136 588</b>	<b>819 530</b>	<b>4 565 875</b>	<b>1 712 203</b>

Таблиця 6.12 – Розрахунок балансової вартості обладнання та суми амортизаційних відрахувань

Найменування обладнання	Кількість устаткування	Ціна за одиницю, тис. грн.	Первісна вартість, тис. грн.	Транспортно-заготівельні витрати, тис. грн. (10%)	Вартість монтажу обладнання, тис. грн. (10%)	Вартість трубопроводу, тис. грн. (5%)	Вартість спецробіт, тис. грн. (10%)	Вартість КВП та їх монтажу, тис. грн. (10%)	Повна вартість обладнання, тис. грн.	Норма амортизації, %	Сума амортизаційних відрахувань, тис. грн.
Реактор-змішувач	10	37,6	376	37,6	75,2	18,8	37,6	37,6	582,8	12	69,936
Реактор-змішувач з сорочкою	2	42,6	85,2	8,52	17,04	4,26	8,52	8,52	132,06	12	15,847
Збірник	20	9,4	188	18,8	37,6	9,4	18,8	18,8	291,4	6	17,484
Фільтр касетний	2	75,2	150,4	15,04	30,08	7,52	15,04	15,04	233,12	25	58,28
Інокулятор	1	54	54	5,4	10,8	2,7	5,4	5,4	83,7	10	8,37
Ферментер	1	59	59	5,9	11,8	2,95	5,9	5,9	91,45	10	9,145
Центрифуга осаджувана	1	65,8	65,8	6,58	13,16	3,29	6,58	6,58	101,99	25	25,498
Хроматографічна колонка	5	143,8	719	71,9	143,8	35,95	71,9	71,9	1 114,45	20	222,89
Невраховане устаткування, (15%)	-	-	254,61	25,461	50,922	12,731	25,461	25,461	394,646	15	59,197
<b>Разом</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1 952,01</b>	<b>195,201</b>	<b>390,402</b>	<b>97,601</b>	<b>195,201</b>	<b>195,201</b>	<b>3 025,616</b>	<b>-</b>	<b>486,647</b>

### 6.5.6 Розрахунок собівартості продукції

До собівартості входить вартість основних виробничих фондів підприємства, оборотні кошти та оборотні фонди, а також опосередковані витрати (вартість утримання адміністративно-управлінського персоналу та інші витрати, які неможливо безпосередньо віднести на собівартість готової продукції). Собівартість розраховують на підставі калькуляції, яку складають або за елементами (для підприємства в цілому), або за статтями (для окремого підрозділу) [162].

Таблиця 6.12 – Кошторис цехових витрат

Стаття витрат	Сума, грн.
1. Заробітна плата цехового персоналу	4 565 875
2. Нарахування на заробітну плату	1 712 203
3. Утримання виробничих будинків і споруд (5% їх вартості)	75 000
4. Поточне наладження виробничих будинків і споруд (2% їх вартості)	37 500
5. Витрати на охорону праці (10% фонду заробітної плати)	456 587
<b>Разом по ст. 1-5:</b>	<b>6 847 165</b>
Знос малоцінного та швидкозношуваного реманенту, витрати на випробування, інші цехові витрати (5% фонду заробітної плати)	228 294
<b>Разом цехові витрати:</b>	<b>7 075 459</b>

Результати розрахунку собівартості річного випуску ІЛ-7 (240г на рік) наведено в таблиці 6.13.

Собівартість одного граму субстанції ІЛ-7 становить 43 478 грн. Приймаємо ринкову вартість субстанції рІЛ-7 45 000 грн., виходячи з розрахунку, що період повернення капіталовкладень повинен складати близько 10 років.

### 6.6 Розрахунок собівартості субстанції рІЛ-7 для курсу лікування.

Розрахуємо вартість субстанції рІЛ-7 для курсу лікування, з метою оцінки соціальної доступності такого лікування серед населення.

Для лікування солідних пухлин використовують разову дозу ІЛ-7 у кількості 3-60мкг на кілограм маси тіла пацієнта через добу. Загальний курс лікування складає 8 доз [157]. З урахуванням, що середня маса тіла дорослої людини становить 70кг, тоді вартість субстанції для курсу лікування становитиме:

$$45000 \cdot 10^{-6} \cdot (3 \div 60) \cdot 70 \cdot 8 = (76 \div 1512) \text{ грн.}$$

При лікуванні гепатиту В та С разова доза ІЛ-7 складає від 3 до 20мкг на кілограм маси тіла пацієнта один раз в тиждень. Загальний курс лікування складає 4 тижні [158]. З урахуванням, що середня маса тіла дорослої людини становить 70кг, розрахуємо вартість субстанції курсу лікування ІЛ-7 для хворих на вірусні гепатити:

$$45000 \cdot 10^{-6} \cdot (3 \div 20) \cdot 70 \cdot 4 = (38 \div 252) \text{ грн.}$$

Таблиця 6.13 – Калькуляція собівартості готової продукції

Стаття калькуляції продукції	Витрати на річний випуск (240г), грн.	Витрати на одиницю готової продукції, грн.	Частка від повної собівартості, %
Сировина та матеріали	513 846	2 141	4,92
Енерговитрати	693 147	2 888	6,64
Заробітна плата виробничих робітників	4 565 875	19 024	43,76
Відрахування на соціальне страхування від зарплати виробничих робітників	1 712 203	7 134	16,41
Витрати на утримання та експлуатацію устаткування	751 916	3 133	7,21
Цехові витрати	797 381	3 322	7,64
<b>Разом цехова собівартість</b>	<b>9 034 368</b>	<b>37 643</b>	<b>86,58</b>
Загальнозаводські витрати (10% цехової собівартості)	903 437	2 657	8,66
<b>Виробнича собівартість</b>	<b>9 937 805</b>	<b>41 408</b>	<b>95,24</b>
Поза виробничі витрати (5% виробничої собівартості)	496 890	2 070	4,76
<b>Повна собівартість</b>	<b>10 434 695</b>	<b>43 478</b>	<b>100,00</b>



Згідно даних літератури [158] для лікування гнійних інфекцій разова доза ІЛ-7 складає 10мкг на кг маси тіла пацієнта 4 рази на тиждень. Загальний курс лікування складає 3 тижні. Отже, вартість субстанції ІЛ-7 для курсу лікування становитиме:

$$45000 \cdot 10^{-6} \cdot 10 \cdot 70 \cdot 4 \cdot 3 = 378 \text{ грн.}$$

## **Висновки до розділу 6**

Виходячи із статистичних даних щодо захворюваності населення України на онкологічні захворювання (пацієнти із солідними пухлинами), вірусні гепатити, ранові інфекції, а також беручи до уваги інноваційний характер препарату на основі рІЛ-7, було розраховано потужність цеху із виробництва відповідної субстанції, яка становить 240г/рік. За один виробничий цикл передбачається виробляти 40г субстанції рІЛ-7, тобто, період роботи підприємства на рік складатиме 6 циклів.

На основі отриманих даних, розрахункова собівартість одного граму субстанції рІЛ-7, яка становить 43 478 грн., тоді рентабельність виробництва складатиме 3,5%, а період повернення капіталовкладень – 8 років 2,4 місяці.

Виходячи з отриманої ринкової вартості субстанції рІЛ-7 було розраховано вартість субстанції для курсу лікування, яка становить для пацієнтів із виявленими солідними пухлинами – 76-1512 грн., для хворих на гепатит В та С – 38-252 грн. й для осіб із діагностованими рановими інфекціями – 378 грн.

## ВИСНОВКИ

У дисертації наведені теоретичне узагальнення і нові шляхи вирішення наукової задачі, що стосується розробки біотехнології субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини (pІЛ-7) та її стандартизації. Результати досліджень дають змогу зробити наступні висновки.

1. Експериментально обґрунтовано раціональний кількісний склад органічних компонентів та мінеральних речовин живильного середовища для культивування рекомбінантного продуценту *E. coli*, що дозволило збільшити вихід pІЛ-7 у 1,3 рази.

2. Доведено стимулюючу дію екстрактів клівії кіноварної і зефірантесу велико квіткового як добавок до живильного середовища при культивуванні рекомбінантних бактерії *E. coli* в діапазоні 0,5-1,0%, що забезпечувало підвищення виходу цільового продукту в 1,69-1,82 рази. Показано стимулюючий вплив ліпосомальної форми вітаміну К<sub>1</sub> в концентрації 15-25мг/мл на рівень біосинтезу pІЛ-7 (збільшення в 1,74-1,82 рази). Показано, що механізми біологічної активності фітоекстрактів на синтез pІЛ-7 бактеріальними продуцентами, включають взаємодію з поверхневими структурами бактеріальної клітини.

3. Розроблено удосконалену схему очистки pІЛ-7 за рахунок введення стадії високоспецифічної імуноафінної хроматографії, що дозволило досягти частоти отримуваної субстанції на рівні 98%. Для синтезованої імуноафінної колонки на основі тетраетоксисилану визначено раціональні технологічні параметри хроматографічної очистки, які дозволяють отримувати високоочищений продукт упродовж 15 циклів безперервної роботи та у широкому діапазоні концентрацій продукту (0,005-20 мкг/мл).

4. Експериментально доведено ефективність застосування pІЛ-7 при лікуванні ранової інфекції *P. aeruginosa*. Показано, що у мишей, які отримували лікування препаратом pІЛ-7 (5мкг на добу внутрішньочеревно), загоєння ран і

елімінація збудника наступає на 5 днів раніше, ніж у мишей без лікування препаратом рІЛ-7.

5. Розроблено технологічну та апаратурно-технологічну схему отримання субстанції рІЛ-7 людини на основі отриманих експериментальних даних. Проведено оцінку ризиків технологічного процесу отримання субстанції рІЛ-7 та визначено найбільш критичні стадії, що дозволило розробити систему контролю виробництва для запобігання та мінімізації ризиків.

6. Проведено техніко-економічну оцінку розробленої технології отримання субстанції рІЛ-7: визначено собівартість кінцевого продукту та потужність виробництва з огляду на забезпеченість пацієнтів України та поширеність відповідних патологій. Розрахункова потужність виробництва склала 240г субстанції рІЛ-7 на рік, а її собівартість – 43 478 грн./г. Розрахункова сировинна собівартість готової ін'єкційної форми препарату рІЛ-7 (3÷60мкг на дозу) становить 38÷1512 грн., що обумовлює його соціальну доступність для населення України.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ніколаєнко ІВ, Шинкаренко ЛМ, Галкін ОЮ, Співак МЯ. Принципи, особливості та застосування гібридної технології. Імунологія та алергологія. 2003;4:7-17.
2. Интерлейкин 7 в базе данных UniProt. [Интернет] Доступно на: <https://www.uniprot.org/uniprot/P13232>
3. Morre MC, Assouline B, Cortez P, Gregoire A. IL-7 Drug substance, composition, preparation and uses. Patent №US7.585.947B2. 2009 Sep. 8.
4. Lin, J., Zhu, Z., Xiao, H., Wakefield, M. R., Ding, V. A., Bai, Q., Fang, Y. The role of IL-7 in Immunity and Cancer. Anticancer research. 2017;37(3):963-967.
5. Malaspina A, Moir S, Ho J, Wang W, Howell ML, O'Shea MA, Roby GA, Rehm CA, Mican JM, Chun TW. Appearance of immature/transitional b cells in hiv-infected individuals with advanced disease: Correlation with increased IL-7. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006;103(7):2262-2267.
6. Lefrançois L and Puddington L. Extrathymic intestinal t-cell development: Virtual reality? Immunology Today. 1995;16(1):16-21.
7. Patel ES, Okada S, Hachey K, Yang L-j, Durum SK, Moreb JS and Chang L-J. Regulation of in vitro human t cell development through interleukin-7 deprivation and anti-cd3 stimulation. BMC Immunology. 2012;13(1):46.
8. Fritzell S, Eberstål S, Sandén E, Visse E, Darabi A and Siesjö P. Ifn $\gamma$  in combination with IL-7 enhances immunotherapy in two rat glioma models. Journal of Neuroimmunol 258(1): 91-95, 2013.
9. Kolybo DV, Labyntsev AA, Romaniuk SI, Kaberniuk AA, Oliinyk OM, Korotkevich NV, Komisarenko SV. Immunobiology of diphtheria. Recent approaches for the prevention, diagnosis and treatment of disease. Біотехнологія. 2013;6(4):43-62.
10. Pokholenko IaO, Gorbatiuk OB, Okunev OV, Irodov DM, Degtiarova MI, Palivoda OG, Kordium VA. Development of the chromatographic medium for

- the affinity isolation of the recombinant hIFN- $\beta$ 1b based on immobilized single-chain antibodies. *Biopolymers and cell*. 2015;31(4):279-284.
11. Dinarello CA. Historical Review of Cytokines. *European Journal of Immunology*. 2011;37(1):34-45.
  12. Zdravkovic N, Rosic M, Lutovac M, Zdravkovic V. Physiology and Pathology of Cytokine: Commercial Production and Medical Use. *IntechOpen*. 2017;3:33-53.
  13. El-Baky NA, Linjawi MH, Redwan EM. Auto-induction expression of human consensus interferon-alpha in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnology*. 2015;15(14):1-10.
  14. Крячок ІА, Титоренко ІБ. Використання гранулоцитарних колонієстимулюючих факторів при проведенні протипухлинної терапії. *Клінічна онкологія* 2015;3(19):64-8.
  15. Скрыпник КА, Косоруков ВС. Человеческий гранулоцитарный колонієстимулюючий фактор в клинической практике. *Российский биотерапевтический журнал*. 2011;10(2):19-24.
  16. Veldkamp CT, Koplinski CA, Jensen DR, Peterson FC, Smits KM, Smith BL, Johnson SK, Lettieri C, Buchholz WG, Solheim JC, Volkman BF. Production of Recombinant Chemokines and Validation of Refolding. *Methods in Enzymology*. 2016;570:539-65.
  17. Lutsenko TN, Kovalenko MV, Galkin OYu. Validation of biological activity testing procedure of recombinant human interleukin-7. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2017;89(1):82-89.
  18. Slyvka AV, Okunev OV. Molecular mechanisms of versatile biological activity of interleukin-7. *Biopolymers and cell*. 2014;30(5):349-357.
  19. Galkin OYu, Lutsenko TM, Gorshunov YuV, Motronenko VV. Development of the method for microbiological purity testing of recombinant human interleukin-7-based product. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2017;89(3):52-59.
  20. Bazdar DA, Kalinowska M, Panigrahi S, Sieg SF: Recycled IL-7 can be delivered to neighboring t cells. *Journal of Immunology*. 2015;194(10):4698-4704.

- 21.Namen AE, Lupton S, Hjerrild K, Wignall J, Mochizuki DY, Schmierer A, Mosley B, March CJ, Urdal D, Gillis S. Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature*.1988;333(6173):571-573.
- 22.Goodwin RG, Lupton S, Schmierer A, Hjerrild KJ, Jerzy R, Clevenger W, Gillis S, Cosman D, Namen AE. Human interleukin-7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.1989;86(1):302-306.
- 23.Huang HY, Luther SA. Expression and function of interleukin-7 in secondary and tertiary lymphoid organs. *Semin Immunology*. 2012;24(3):175-189.
- 24.Craig Craig A, Julie AD, Scott TR. Structural and Biophysical Studies of the Human IL-7/IL-7Ra Complex. *Structure*.2009;17(1):54-65.
- 25.Kerzerho J, McIlvaine EJ, Anthony P, Mack WJ, Wang C-H, Frederick T, Operskalski E, Chen Z, Al-Harthi L and Landay A: Impact of hepatitis c virus on the circulating levels of IL-7 in hiv-1 coinfectd women. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2016;71(2):172-180.
- 26.Morre M, Beq S: Interleukin-7 and immune reconstitution in cancer patients: A new paradigm for dramatically increasing overall survival. *Targeted Oncology*. 2012;7(1):55-68.
- 27.Lundström W, Fewkes N, Mackall CL. IL-7 in human health and disease. *Seminars in Immunology*. 2012;24(3):218-224.
- 28.Dawood A, Abdul Basit S, Jayaraj M, Gish RG. Drugs in Development for Hepatitis B. *Drugs*. 2017;77(12):1263-1280.
- 29.Shindo Y, Fuchs AG, Davis CG, Eitas T, Unsinger J, Burnham CD, Green JM, Morre M, Bochicchio GV, Hotchkiss RS. Interleukin 7 immunotherapy improves host immunity and survival in a two-hit model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Journal of Leukocyte Biology*. 2017;101(2):543-554.
- 30.Glick BR, Pasternak JJ. *Molecular biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA*. 3rd ed. Washington DC. 2003:760 p.

31. Катлинский АВ, Сазыкин ЮО, Орехов СН, Чакалева ИИ. Курс лекций по биотехнологии. Москва 2005:52 с.
32. Burgess-Brown NA, Sharma S, Sobott F, Loenarz C, Oppermann U, Gileadi O. Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study. *Protein Expression and Purification*. 2008;59(1):94–102.
33. Devi N, Adivitiya, Khasa YP. A combinatorial approach of N-terminus blocking and codon optimization strategies to enhance the soluble expression of recombinant hIL-7 in *E. coli* fed-batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016;100(23):9979–9994.
34. Ni Y, Chen R. Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*. 2009;31(11):1661-1670.
35. Луценко ТН, Галкин АЮ. Обоснование биотехнологических подходов получения интерлейкина-7 человека рекомбинантного. *Труды БГТУ*. 2015;4(177):188–197.
36. Tripathi NK. Production and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli*. *ChemBioEng Rev*. 2016;3(3):116-133.
37. Langlais C, Korn B. Recombinant Protein Expression in Bacteria. In: *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2005
38. Palomares LA, Estrada-Mondaca S, Ramírez OT. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods in Molecular Biology*. 2004;267:15-52.
39. Sivashanmugam A, Murray V, Cui C, Zhang Y, Wang J, Li Q. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Science*. 2009;18(5):936–948.
40. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*. 2009;27(3):297-306.
41. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*. 2014;5:17.

- 42.Нечаєва ЯО, Грабчук СМ, Горшунов ЮВ, Мотроненко ВВ, Галкін ОЮ. Рекомбінантні білки терапевтичного призначення: особливості отримання, вивчення безпечності та ефективності (літературний огляд). Вісник Запорізького національного університету. 2017;2:85-93.
- 43.Graumann K, Premstaller A. Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnology Journal*. 2006;1(12):164-186.
- 44.Sorensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 2005;115(2):113-128.
- 45.Joseph BC, Pichaimuthu S, Srimeenakshi S, Murty M, Selvakumar K, M G, Manjunath SR. An overview of the parameters for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Cell Science and Therapy*. 2015;6(5):1-7.
- 46.Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA Polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*. 1986;189(1):113-130.
- 47.Huang CJ, Lin H, Yang X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2012;39(30):383-399.
- 48.Славченко ІЮ, Борейко ЕВ. Фенотипические проявления особенностей метаболизма клеток *Escherichia coli* BL21(DE3) при выращивании на средах, содержащих различные источники углерода. *Биополимеры и клетка*. 2002;18(3):232-236.
- 49.Gopal GJ, Kumar A. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *The Protein Journal*. 2013;32(6):419-425.
- 50.Van Leen RW, Bakhuis JG, van Beckhoven RFWC, Burger H, Dorssers LCJ, Hommes RWJ, Lemson PJ., Noordam B, Persoon NLM, Wagemaker G. Production of human interleukin-3 using industrial microorganisms. *Biotechnology (NY)*. 1991;9(1):47-52.



- 51.Chen R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology Advances*. 2012;30(5):1102-1107.
- 52.Vranken K, Anne J. Secretory production of recombinant proteins by *Streptomyces*. *Future Microbiology*. 2009;4(2):181-188.
- 53.Squires CH, Retallack DM, Chew LC Ramseier TM, Schneider JC, Talbot HW. Heterologous protein production in *P. fluorescens*. *BioProcess International*. 2004;12:54-59.
- 54.Гончарова ОВ, Чугунова НМ. Обеспечение стабильности процессов культивирования штаммов *E. coli* – продуцентов рекомбинантных цитокинов. // Современные наукоемкие технологии. 2006;8:77-78.
- 55.SOC medium preparation [Интернет] Доступно на: [http://2014.igem.org/wiki/images/6/64/BGU14-06-SOC\\_medium\\_prep.pdf](http://2014.igem.org/wiki/images/6/64/BGU14-06-SOC_medium_prep.pdf)
- 56.GYT – CSH Protocols [Интернет] Доступно на: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec8727.full#sec-2>
- 57.Terrific broth [Интернет] Доступно на: [https://openwetware.org/wiki/Terrific\\_Broth](https://openwetware.org/wiki/Terrific_Broth)
- 58.Super broth [Интернет] Доступно на: <https://www.usbio.net/protocols/super-broth>
- 59.Яковлева ВС, Николаева ЗК, Егорова ВН. Способ получения препарата интерлейкина-2, препарат интерлейкина-2 и фармацевтический иммуномодулирующий препарат. Патент на изобретение Русской Федерации RU 2565553 №2013115658/10; заявл. 09.04.2013; опубл. 20.10.2015. Бюл. № 29.
- 60.Мясников АН, Смирнов МН, Авот АЯ, Грен ЭЯ, Романчикова НВ, Циманис АЮ. Рекомбинантная плазмидная днк pjdb (msil), обеспечивающая синтез интерлейкина-2 человека в клетках дрожжей *Saccharomyce scerevisiae*, способ ее получения и штамм дрожжей *Saccharomyce scerevisiae* – продуцент интерлейкина-2 человека Патент на изобретение СССР SU 1770359 №4392922/13; заявл. 24.03.89; опубл. 23.10.92. Бюл. № 39.

- 61.Sengupta P, Meena K, Mukherjee R, Jain SK, Maithal K. Optimized conditions for high-level expression and purification of recombinant human interleukin-2 in *E. coli*. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics. 2008;45(2):91-97.
- 62.Гуревич АИ, Качалина ТА, Мирошников АИ, Свердлов ЕД, Ажикина ТЛ, Росташов ВМ, Есипов РС, Вульфсон АН, Тихонов РВ, Костромина Т.И.. Способ получения рекомбинантного интерлейкина-3 человека, рекомбинантная плазмидная ДНК рЗРТЕIL3, кодирующая рекомбинантный интерлейкин-3 человека, штамм бактерий *Escherichia coli* – продуцент рекомбинантного интерлейкина-3 человека. Патент на изобретение Русской Федерации RU2099421 №95109756/13; заявл. 13.06.1995; опубл. 20.12.1997.
- 63.Ahmed N, Abbas R, Khan MAh, Bashir H, Tahir S, Zafar AhU. Enhancing recombinant interleukin-6 production yield by fermentation optimization, two stepsdenaturing (2DR) and one step purification. Biotechnology and Applied Biochemistry. 2018;65(3):490-496.
- 64.Луценко ТМ. Біотехнологія препаратів рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та їх стандартизація. Автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. техн. наук: 03.00.20 «Біотехнологія»; К. 2018:24 с.
- 65.Zhong Y, Yang L, Guo Y, Fang F, Wang D, Li R, Jiang M, Kang W, Ma J, Sun J, Xiao W. High-temperature cultivation of recombinant *Pichia pastoris* increases endoplasmic reticulum stress and decreases production of human interleukin-10. Microbial Cell Factories. 2014;13(163):1-10.
- 66.Колобов АА. Получение рекомбинантного антагониста рецептора интерлейкина-36 человека и изучение его физико-химических и биологических свойств Дисс. на получения науч. степени канд. биол. наук: 03.01.04 «Биохимия»; Санкт-Петербург. 2017:169 с.
- 67.Yang XM, Xu L, Eppstein L. Production of recombinant human interferon- $\alpha$  1 by *Escherichia coli* using a computer-controlled cultivation process. Journal of Biotechnology. 1992;23(3):291-301.
- 68.Ищенко АМ, Митрофанов ЕВ, Симбирцев АС, Соловьева ЛЯ, Мартюшин СВ, Родин СВ, Жахов АВ, Полякова ЕА, Антипова ТО,

- Протасов ЕА, Котов АЮ, Трофимов АВ, Свентицкий ЕН. Способ получения рекомбинантного интерферона альфа-2b и интерферонсодержащий препарат (варианты). Патент на изобретение Российской Федерации RU 2294372 №2005118531/13; заявл. 16.06.2005; опубл. 27.02.2007. Бюл. № 6.
- 69.Pal D, Tripathy RK, Teja MS, Kumar M, Banerjee UCh, Pande AN. Antibiotic-free expression system for the production of human interferon-beta protein. 3 Biotech. 2018;8(36):1-7.
- 70.Khalilzadeh R, Shojaosadati SA, Maghsoudi N, Mohammadian-Mosaabad J, Mohammadi MR, Bahrami A, Maleksabet N, Nassiri-Khalilli MA, Ebrahimi M, Naderimanesh H. Process development for production of recombinanthuman interferon- $\gamma$  expressed in *Escherichia coli*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2004;31(2):63-69.
- 71.Елистратов ПА. Новый эффективный подход для получения рекомбинантных белков основного фактора роста фибробластов (FGF-2) и лиганд-связывающего внеклеточного домена рецептора II типа TGF- (TRII-ED) в *E. coli*. Автореф. дисс. на получение науч. степени канд. биол. наук: 03.01.04 «Биохимия». Москва. 2011:12 с.
- 72.Пустошилова НМ, Килева ЕВ, Денисова ЛЯ, Шингарева НВ, Коробко ВГ, Денисов ЛА, Масычева ВИ, Сандахчиев ЛС, Калинин ЮТ. Способ получения рекомбинантного фактора некроза опухолей альфа человека Патент на изобретение Российской Федерации RU 2144958; заявл. 23.04.1997; опубл. 27.01.2000.
- 73.Тихонов РВ, Якимов СА, Коробко ВГ, Вульфсон АН. Эффективные методы очистки рекомбинантного  $\alpha$ -фактора некроза опухолей человека. Биоорганическая химия. 1996;22(3):163-168.
- 74.Yang J, Moyana T, Mackenzie S, Xia Q, Xiang J. One hundred seventy-fold increase in excretion of an FV fragment-tumor necrosis factor alpha fusion protein (sFV/TNF-alpha) from *Escherichia coli* caused by the synergistic effects

- of glycine and triton X-100. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998;64(8):2869-2874.
75. Баронец НГ. Получение стимуляторов роста микроорганизмов из лекарственных растений. Диссертация на получение науч. степени канд. биол. наук: 03.00.07 «Микробиология». М. 2005:130 с.
76. Перерва ТП, Мирюта АЮ, Мойса ЛН, Можилевская ЛП, Кунах ВА. Взаимодействие растительных экстрактов *Ungernia victoris*, *Rhodiola rosea* и *Polyscias filicifolia* с бактериальной клеткой. *Цитология та генетика*. 2010;44(4):34-40.
77. Перерва ТП, Кобозев ЮА, Мойса ЛН, Дворник АС, Мирюта АЮ, Можилевская ЛП, Кунах ВА. Повышение продуктивности рекомбинантных штаммов *Escherichia coli* обогащением питательной среды добавкой растительного происхождения *Біотехнологія*. 2012;5(1). – С. 42-47.
78. Галкин АЮ, Горшунов ЮВ, Бесараб АБ, Луценко ТН, Гришина АС. Влияние добавок растительного происхождения к питательной среде на уровень биосинтеза рекомбинантного белка бактериями *Escherichia coli*. *Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки*. 2015;1:184-194.
79. Казеев ИВ. Масштабирование процесса микробиологического синтеза рекомбинантных белков (на примере получения рекомбинантного человеческого  $\alpha 2$ -интерферона). Автореф. дис. на получение науч. степени канд. техн. наук: 05.17.08 «Процессы и аппараты химических технологий», 03.00.23 «Биотехнология». Москва. 2009:18 с.
80. Huang J, Dhulster P, Thomas D, Barbotin JN. Agitation rate effects on plasmid stability in immobilized and free-cell continuous cultures of recombinant *E. coli*. *Enzyme and Microbial Technology*. 1990;12(12):933-939.
81. Saito I, Hondaa H, Kawabe T, Mukumotob F, Shimizu M, Kobayashi T. Comparison of biotin production by recombinant *Sphingomonas* sp. under various agitation conditions. *Biochemical Engineering Journal*. 2000;5(2):129-136.

82. Demirtas MU, Kolhatkar A, Kilbane JJ. Effect of aeration and agitation on growth rate of *Thermus thermophilus* in batch mode. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2003;95(2):113-117.
83. Potumarthi R, Ch. S, Jetty A. Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: Effect of aeration and agitation regimes. *Biochemical Engineering Journal*. 2007;34(2):185-192.
84. Kumar R, Banoth L, Banerjee UC, Kaur J. Enantiomeric separation of pharmaceutically important drug intermediates using a Metagenomic lipase and optimization of its large scale production. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016;95(10):1-32.
85. Khamduang M, Packdibamrung K, Chutmanop J, Chisti Y, Srinophakun P. Production of L-phenylalanine from glycerol by a recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2009;36(10):1267-1274.
86. Helianti I, Ulfah M, Nurhayati N, Suhendar D, Finalissari AK, Wardani AK. Production of xylanase by recombinant *Bacillus subtilis* DB104 cultivated in agroindustrial waste medium. *Hayati Journal of Biosciences*. 2016;23(3):125-131.
87. Chamsartra S, Hewitt CJ, Nienow AW. The impact of fluid mechanical stress on *Corynebacterium glutamicum* during continuous cultivation in an agitated bioreactor. *Biotechnology Letters*. 2005;27(10):693–700.
88. Wase DAJ, Patel YR. Variations in the volumes of microbial cells with change in the agitation rates of chemostat cultures. *Journal of General Microbiology*. 1989;131(4):725-736.
89. Казеев ИВ, Воронова НИ, Гусева ЕВ, Меньшуткина НВ. Изучение кинетики синтеза рекомбинантного  $\alpha 2$ -интерферона в клетках *Escherichia coli*. *Успехи в химии и химической технологии*. 2007;1(69):32-36.
90. Priya A, Dureja P, Talukdar P, Rath R, Lal B, Sarma PM. Microbial production of 2,3-butanediol through a two-stage pH and agitation strategy in 150l bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. 2016;105:159-167.

91. Гильчук ПВ. Оценка методов ренатурации для промышленного получения рекомбинантных белков из телец включения *Escherichia coli* в биологически активной форме Біополімери і клітина. 2004;20(3):182-192.
92. Луценко ТМ. Біотехнологія препаратів рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та їх стандартизація. Дис. на здобуття наук. ступеня канд. техн. наук: 03.00.20 «Біотехнологія». К. 2018:180 с.
93. Астрелін ІМ, Концевой АЛ, Концевой СА. Основи наукових досліджень. Навч. посіб. для студ. спец. 161 Хімічні технології та інженерія, спеціалізація «Хімічні технології неорганічних речовин та водоочищення». Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського. 2017:315 с.
94. Досон Р, Эллиот Д, Эллиот У, Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир. 1991:544 с.
95. Galkin OYu, Kotov AG. Study of biologically active substances content in herbal preparation for the treatment and prevention of alopecia. Украинский журнал клинической и лабораторной медицины. 2011;6(1):60-63.
96. Ломбоева СС, Танхаева ЛМ, Олейников ДН. Методика количественного определения суммарного содержания флавоноидов в надземной части ортилии однобокой (*Orthilia secunda* (L.) House). Химия растительного сырья. 2008;2:65-68.
97. Шукирбекова АБ. Изучение ликорина гидрохлорида в химико-токсикологическом отношении. Автореф. дис. на получение науч. степени канд. фарм. наук: 15.00.02 «Фармацевтическая химия та фармакогнозия». М. 1991:20 с.
98. Campani V, Marchese D, Pitaro MT, Pitaro M, Grieco P, De Rosa G. Development of a liposome-based formulation for vitamin K<sub>1</sub> nebulization on the skin. International Journal of Nanomedicine. 2014;9:1823-1832.
99. Плохинский НА. Биометрия. М.: Изд-во Моск. гос. ун-та. 1970:367 с.
100. Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiology Reviews. 2007;31(4):425-448.

101. Юрасов НА. Иммуноаффинное концентрирование и тест-определение некоторых полициклических ароматических углеводов и микотоксинов. Автореф. дисс. на получения науч. степени канд. хим. наук 02.00.02 «Аналитическая химия». Саратов. 2011:20 с.
102. Altstein M, Bronshtein A, Glattstein B. Immunochemical approaches for purification and detection of TNT traces by antibodies entrapped in a sol-gel matrix. *Analytical Chemistry*. 2001;73(11):2461-2467.
103. РМГ 61-2010. Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. М.: Стандартинформ, 2012:60 с.
104. Урбах ВЮ. Математическая статистика для биологов и медиков. М.: Издательство АН СССР. 1963:321 с.
105. Adinarayana K, Ellaiah P. Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus sp.* *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002;5(3):272-278.
106. Omotani S, Tani K, Nagai K, Hatsuda Y, Mukai J, Myotoku M. Water Soluble Vitamins Enhance the Growth of Microorganisms in Peripheral Parenteral Nutrition Solutions. *International Journal of Medical Sciences*. 2017;14(12):1213-1219.
107. Wang H, Wang F, Wang W, Yao X, Wei D, Cheng H, Deng Z. Improving the expression of recombinant proteins in *E. coli* BL21 (DE3) under acetate stress: an alkaline pH shift approach. *PLoS One*. 2014;9(11):e112777.
108. Boiko MV, Patyka NV, Shulga SM, Tigunova OO, Andriiash HS. Mathematical modelling of optimization nutrient medium composition for entomopathogenic bacteria strain *Bacillus thuringiensis* 87/3 cultivation. *Biotechnologia Acta*, 2018;11(2):40-46.
109. Wang JK, Chiu HH, Hsieh CS. Optimization of the medium components by statistical experimental methods to enhance nattokinase activity. *Food Journal of Health Sciences*, 2009;1(1):21-27.

110. Singh V, Haque S, Niwas R, Srivastava A, Pasupuleti M, Tripathi CK. Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review. *Frontiers in Microbiology*. 2017;7:2087.
111. Nair JJ, van Staden J. Pharmacological and toxicological insights to the South African Amaryllidaceae. *Food and Chemical Toxicology*. 2013;62:262-275.
112. Veale DJH, Oliver DW, Arangies NS, Furmana KI. Preliminary isolated organ studies using an aqueous extract of *Clivia miniata* leaves *Journal of Ethnopharmacology*. 1989;27(3):341-346.
113. Katoch D, Kumar S, Kumar N, Singh B. Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC-DAD/ESI-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012;71:187-192.
114. Piana M, Silva MA, Trevisan G, de Brum TF, Silva CR, Boligon AA, Oliveira SM, Zadra M, Hoffmeister C, Rossato MF, Tonello R, Laporta LV, de Freitas RB, Belke BV, Jesus Rda S, Ferreira J, Athayde ML. Antiinflammatory effects of *Viola tricolor* gel in a model of sunburn in rats and the gel stability study. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013;150(2):458-465.
115. Khalifa MF, Attia EZ, Fahim JR, Kamel MS. An overview on the chemical and biological aspects of lycorine alkaloid. *Journal of Advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 2018;1(2):41-49.
116. Vrijssen R, Vanden Berghe DA, Vlietinck AJ, Boeyé A. Lycorine: a eukaryotic termination inhibitor? *Journal of Biological Chemistry*. 1986;261(2):505-507.
117. Randall-Hazelbauer L, Schwartz M. Isolation of bacteriophage lambda receptor from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1973;116(3):1436-1446.
118. Datta DB, Arden B, Henning U. Major proteins of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors // *Journal of Bacteriology*. 1977;131(3):821-829.



119. Morona R, Henning U. Host range mutants of bacteriophage O<sub>x2</sub> can use two different outer membrane proteins of *Escherichia coli* K<sub>12</sub> as receptors // Journal of Bacteriology. 1984;159(2):579-582.
120. Лихачева АА, Синеокий СП. Фаговые рецепторы *Escherichia coli*. Основные компоненты наружной мембраны *E. coli* как фаговые рецепторы. Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология. 1989;10:3-15.
121. Galkin OYu, Besarab OB, Gryshyna AS, Dugan OM, Gurzhenko YuM. Biotechnology for obtaining the recombinant heat shock protein (HSP-60) of *Chlamydia trachomatis* and evaluation of the perspectives of its use in serological diagnostics. Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи). 2014;6(2):132-140.
122. Lindberg AA. Bacteriophage receptors. Annual Review of Microbiology. 1973;28:207-241.
123. Van Alphen W, Lugtenberg B. Influence of osmolarity of the growth medium on the outer membrane protein pattern of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 1977;131(2):623-630.
124. Kawaji H, Mizuno T, Mizushima S. Influence of molecular size and osmolarity of sugars and dextrans on the synthesis of outer membrane proteins O<sub>8</sub> and O<sub>9</sub> of *Escherichia coli* K<sub>12</sub>. Journal of Bacteriology. 1979;140(3):843-884.
125. Russo FD, Slauch JM, Silhavy TJ. Mutations that affect separate functions of OmpR the phosphorylated regulator of porin transcription in *Escherichia coli*. Journal of Molecular Biology. 1993;231(2):261-273.
126. Під ред. Гризодуба ОІ. Державна фармакопея України. Перше видання. Доповнення 2. Х.: ПІРЕГ. 2008:617 с.
127. Uhlén M. Affinity as a tool in life science. BioTechniques. 2008;44(5):649-654.
128. Thompson NE, Foley KM, Stalder ES, Burgess RR. Methods in Enzymology. Guide to Protein Purification, 2nd Edition. 2009;463:475-494.

129. Галкін ОЮ. Одержання імуноафінного сорбенту та розробка методики специфічного виділення IgM людини. Наукові вісті НТУУ «КПІ». 2009;2:98-102.
130. Николаенко ИВ, Гончаренко ВС, Шимко НН, Галкин АЮ. Выделение поверхностного антигена вируса гепатита В. Український біохімічний журнал. 2007;79(2)114-122.
131. Русанова ТЮ, Левина НА, Юрасов НА, Горячева ИЮ. Нанопористые золь-гель материалы с иммобилизованными антителами для иммуноаффинного концентрирования пирена. Сорбционные и хроматографические процессы. 2009;9(3):391-398.
132. Галкін ОЮ, Горшунов ЮВ, Дуган ОМ Розробка імуноафінного методу виділення IgE людини із біологічних рідин. Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені В. Гнатюка. Серія: біологія. 2015;2:65-72.
133. Hafiz A. Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization. CRC Press. 2004:143 p.
134. Sharif M, Wong CHM, Harky A. Sternal Wound Infections, Risk Factors and Management – How Far Are We? A Literature Review. Heart, Lung and Circulation. 2019;28(6):835-843.
135. Cefalu JE, Barrier KM, Davis AH. Wound Infections in Critical Care. Critical Care Nursing Clinics of North America. 2017;29(1):81-96.
136. Dou Y, Huan J, Guo F, Zhou Z, Shi Y. Pseudomonas aeruginosa prevalence, antibiotic resistance and antimicrobial use in Chinese burn wards from 2007 to 2014. Journal of International Medical Research. 2017;45(3):1124-1137.
137. Decraene V., Ghebrehewet S., Dardamissis E., Huyton R., Mortimer K., Wilkinson D., Shokrollahi K., Singleton S., Patel B., Turton J., Hoffman P., Puleston R. An outbreak of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa in a burns service in the North of England: challenges of infection prevention and

- control in a complex setting. *Journal of Hospital Infection*. 2018;100(4):e239-e245.
138. Nichols DP, Caceres S, Caverly L, Fratelli C, Kim SH, Malcolm K, Poch KR, Saavedra M, Solomon G, Taylor-Cousar J, Moskowitz S, Nick JA. Effects of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infection. *Journal of Surgical Research*. 2013;183(2):767-776.
  139. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*. 2019;37(1):177-192.
  140. Pachori P, Gothwal R, Gandhi P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes and Diseases*. 2019;6(2):109-119.
  141. Nasser M, Ogali M, Kharat AS. Prevalence of MDR *Pseudomonas aeruginosa* of war-related wound and burn ward infections from some conflict areas of Western Yemen. *Wound Medicine*. 2018;20:58-61.
  142. Данчин АО, Поліщук МЄ, Казімчук АП, Данчин ГО. Вогнепальні поранення м'яких тканин склепіння черепаюю Київ: Лазурит-Поліграф. 2017:116 с.
  143. Наказу МОЗ України №236 від 04.04.2012р. «Про організацію контролю та профілактики післяопераційних гнійно-запальних інфекцій, спричинених мікроорганізмами, резистентними до дії антимікробних препаратів»
  144. Gellatly SL, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa* : new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*. 2013;67(3)159-173.
  145. Чорнопищук РІ. Локальна імунокорекція в комплексному лікуванні інфікованих ран: монографія. Вінниця. 2017:210 с.
  146. Ковальчук ЛІВ, Ганковская ЛВ, Левченко ВА. Иммунокоррекция цитокинами. *Вестник РГМУ*. 2002;36-12.
  147. Namen AE, Schmierer AE, March CJ, Overell RW, Park LS, Urdal DL, Mochizuki DY. B cell precursor growth-promoting activity. Purification and

- characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors. *Journal of Experimental Medicine*. 1988;167(3):988-1002.
148. Goodwin RG, Lupton S, Schmierer A. Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86:302-306.
  149. Namen AE, Lupton S, Hjerrild K, Wignall J, Mochizuki DY, Schmierer A, Mosley B, March CJ, Urdal D, Gillis S. Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature*. 1988;333(6173):571-3.
  150. Lee G, Namen AE, Gillis S, Kincade PW. Recombinant interleukin-7 supports the growth of normal B lymphocyte precursors. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 1988;141:16-18.
  151. Takeda S, Gillis S, Palacios R. In vitro effects of recombinant interleukin 7 on growth and differentiation of bone marrow pro-B-and pro-T-lymphocyte clones and fetal thymocyte clones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989; 86:1634-1638.
  152. Slyvka AV, Okunev OV. Molecular mechanisms of versatile biological activity of interleukin-7. *Biopolymers and cell*. 2014;30(5):349-357.
  153. Вироби медичні. Системи управління якістю. Вимоги щодо регулювання: ДСТУ ISO 13485:2005. Введено вперше; чинний від 01.10.2006. К.: Держспоживстандарт України. 2007:56 с.
  154. Лікарські засоби. Належна виробнича практика: Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016 [затверджена наказом Міністерства охорони здоров'я України від 29.07.2016 р. No 798]. К.: МОЗ України. 2016:358 с.
  155. Вироби медичні. Настанови щодо управління ризиком: ДСТУ ISO 14971:2009. Введено вперше; чинний від 01.01.2012. К.: Держспоживстандарт України, 2009:68 с.
  156. Mackall CL, Fry TJ, Gress RE. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nature Reviews Immunology* 2011;11(5):130-142.

157. Звіт МОН Форма №7. Звіт про захворюваність на злоякісні новоутворення за 2018р. [Інтернет] Доступно на: <http://medstat.gov.ua/im/upload/Forma-07-18.zip>
158. ClinicalTrials. [Інтернет] Доступно на: <https://clinicaltrials.gov/>.
159. Сергєєва ТА. Гепатит С в Україні: епідеміологічна характеристика та оцінка трагедії (за результатами даних з різних джерел). Київ: Центр громадського здоров'я. 2018:111 с.
160. Сергєєва ТА. Гепатит В в Україні: епідеміологічна характеристика та оцінка трагедії (за результатами даних з різних джерел). Київ: Центр громадського здоров'я. 2018:136 с.
161. Джулай ОС, Бондаренко ЮГ, Рябовол ВМ. Окремі особливості епідемічного процесу та профілактики внутрішньо-лікарняних інфекцій на сучасному етапі з досвіду роботию. [Інтернет] Доступно на: [http://www.oblses.ck.ua/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1622:2019-03-27-10-39-58&catid=86:2018-02-14-12-19-27&Itemid=50](http://www.oblses.ck.ua/index.php?option=com_content&view=article&id=1622:2019-03-27-10-39-58&catid=86:2018-02-14-12-19-27&Itemid=50).
162. Підлісна ОА, Янковий ВВ, Дорошенко МП. Методичні вказівки до виконання організаційно-економічної частини дипломних проектів. К.: «Політехніка» НТУУ «КПІ». 2002:28 с.
163. Держбюджет - 2020: мінімальна зарплата. [Інтернет] Доступно на: <https://zib.com.ua/ua/140047-derzhbyudzhets-2020-minimalna-zarplata.html>.

## ДОДАТОК А

### ДОВІДКА про апробацію та впровадження науково-технічної розробки

Об'єкт апробації та впровадження: науково-методичні підходи до отримання рекомбінантних білків, стандартизації їх якості та технології виготовлення (на прикладі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини).

Джерело науково-технічної інформації – наукові публікації:

- Galkin O.Yu., Lutsenko T.M., Gorshunov Yu.V., Motronenko V.V. Development of the method for microbiological purity testing of recombinant human interleukin-7-based product // Ukrainian Biochemical Journal. – 2017. - Vol. 89, № 3. - P. 52-59.
- Луценко Т.М., Горшунов В.Ю., Мотроненко В.В., Галкін О.Ю. Оцінка ризиків у технології препарату на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та її перспективна валідація // Наукові вісті НТУУ "КПІ". - 2017. - №3. – С. 56-63.
- Grigorieva S.M., Starosyla D.B., Rybalko S.L., Motronenko V.V., Lutsenko T.M., Galkin O.Yu. Effect of recombinant human interleukin-7 on *Pseudomonas aeruginosa* wound infection // Ukrainian Biochemical Journal, 2019, Vol. 91, N 5. P.9-17.
- Motronenko V., Lutsenko T., Galkin A., Gorshunov Y., Solovjova V. Optimization of the culture medium composition to increase the biosynthesis of recombinant human interleukin-7 in *Escherichia coli* // Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. – 2020 - Vol. 9. - № 4. P. 761-768.

Підрозділ, відповідальний за апробацію та впровадження: відділ регуляторних відносин, менеджменту якості і науково-технічних розробок.

Період, протягом якого проводилася апробація: 07-12.2019 р.

Результати апробації та впровадження: досягнуто оптимізацію процедур отримання рекомбінантних білків, стандартизації їх якості та технології виготовлення; проведено перспективну валідацію технології отримання субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини із застосуванням системи аналізування ризиків та критичних контрольних точок, яка підтвердила стабільність процесу та його відповідність критеріям прийнятності.

Відповідальні за апробацію та впровадження:

**Заступник начальника відділу  
регуляторних відносин, менеджменту якості  
та науково-технічних розробок  
ТОВ «УА «ПРО-ФАРМА»**



**А.І. Спіжова**

**Провідний спеціаліст із стандартизації,  
сертифікації та якості, к.т.н.**

**Т.М. Луценко**

02.03.2020 р.



## ДОДАТОК Б

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор

Національного технічного університету

України «Київський політехнічний

інститут імені Ігоря Сікорського»

академік НАН України, д.т.н., проф.



Юрій ЯКИМЕНКО

2020 р.

**ДОВІДКА ПРО ВИКОРИСТАННЯ**

результатів дисертаційної роботи Мотроненко Валентини Василівни  
«Біотехнологія субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини» у  
навчальному процесі кафедр промислової біотехнології Національного  
технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені  
Ігоря Сікорського»

Ми, ті що нижче підписалися, комісія у складі: завідувача кафедри трансляційної медичної біоінженерії д.б.н., проф. Галкіна О.Ю., к.б.н., доцента кафедри трансляційної медичної біоінженерії Беспалової О.Я., старшого викладача кафедри трансляційної медичної біоінженерії, к.т.н. Луценко Т.М. склали акт про використання результатів дисертаційної роботи Мотроненко Валентини Василівни «Біотехнологія субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини» у навчальному процесі кафедри трансляційної медичної біоінженерії, а саме були розроблені та впроваджені нові програми навчальної дисциплін: Медична біотехнологія для студентів спеціальності 163 Біомедична інженерія.

Зав. каф. ТМБ, д.б.н., проф.

к.б.н., доц. каф. ТМБ

к.т.н. ст. викл. каф. ТМБ

Олександр ГАЛКІН

Олена БЕСПАЛОВА

Тетяна ЛУЦЕНКО

## ДОДАТОК В

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор  
Національного технічного університету  
України «Київський політехнічний  
інститут імені Ігоря Сікорського»  
академік НАН України, д.т.н., проф.



Юрій ЯКИМЕНКО

2020 р.

## ДОВІДКА ПРО ВИКОРИСТАННЯ

результатів дисертаційної роботи Мотроненко Валентини Василівни  
«Біотехнологія субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини» у  
навчальному процесі кафедри промислової біотехнології Національного  
технічного університету України «Київський політехнічний інститут  
імені Ігоря Сікорського»

Ми, ті що нижче підписалися, комісія у складі: завідувача кафедри промислової біотехнології, д.т.н., доц. Тодосійчук Т.С., завідувача кафедри трансляційної медичної біоінженерії д.б.н., проф. Галкіна О.Ю., доцента кафедри промислової біотехнології, к.т.н, доц. Клечак І.Р. склали акт про використання результатів дисертаційної роботи Мотроненко Валентини Василівни «Біотехнологія субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини» у навчальному процесі кафедри промислової біотехнології, а саме: були розроблені та впроваджені нові програми навчальної дисципліни «Медична біотехнологія-2. Імунобіотехнологія» для студентів спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія.

Зав. каф. ПБТ, д.т.н., доц.

Зав. каф. ТМБ, д.б.н., проф.

Доц. каф. ПБТ, к.т.н., доц.

Тетяна ТОДОСІЙЧУК

Олександр ГАЛКІН

Інна КЛЕЧАК